



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

Incorporación y efectos tóxicos de nanopartículas de óxidos metálicos en organismos acuáticos

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

Julián Gigena

Director de tesis: Dra. Noemí Rosario Verrengia Guerrero
Director Asistente: Dra. Adriana Cristina Cochón

Consejero de estudios: Dra. María del Carmen Ríos de Molina

Buenos Aires, 2019

Incorporación y efectos tóxicos de nanopartículas de óxidos metálicos en organismos acuáticos.

Resumen

Se investigaron distintas etapas relacionadas con la toxicocinética de nanopartículas (NPs) de goethita (α -FeOOH) y de magnetita (Fe_3O_4) (absorción, distribución, eliminación) en dos especies de invertebrados dulceacuícolas: *Lumbriculus variegatus* (oligoqueto) y *Biomphalaria glabrata* (gasterópodo). También, se determinaron parámetros biomarcadores relacionados con procesos de estrés oxidativo y efectos neurotóxicos en organismos expuestos en forma aguda (48 h). Además, se estudió la influencia de sustancias húmicas y de elementos metálicos (Cd y Pb) en la biodisponibilidad de dichas NPs.

Los gasterópodos fueron capaces de absorber las NPs de goethita mientras que *L. variegatus* no evidenció un verdadero proceso de absorción. Por estudios previos se sabía que algunos parámetros relacionados a estrés oxidativo aumentaban en los oligoquetos expuestos a nano-goethita. Del mismo modo ocurrió en *B. glabrata*, aunque en ningún caso se observó peroxidación lipídica. Los parámetros estudiados no resultaron afectados en los oligoquetos expuestos a nano-magnetita. Tampoco se encontraron cambios en el biomarcador de neurotoxicidad en ningún caso.

La presencia simultánea de sustancias húmicas modificó la biodisponibilidad de las NPs de goethita en ambas especies. Luego de exponer a los organismos a una mezcla binaria de NPs en presencia de Cd o Pb únicamente se observaron cambios en la biodisponibilidad del Cd y nano-goethita.

Palabras claves: nanopartículas de goethita, nanopartículas de magnetita, *Lumbriculus variegatus*, *Biomphalaria glabrata*, parámetros biomarcadores, estrés oxidativo, efectos tóxicos.

Incorporation and toxic effects of metal oxide nanoparticles in aquatic organisms

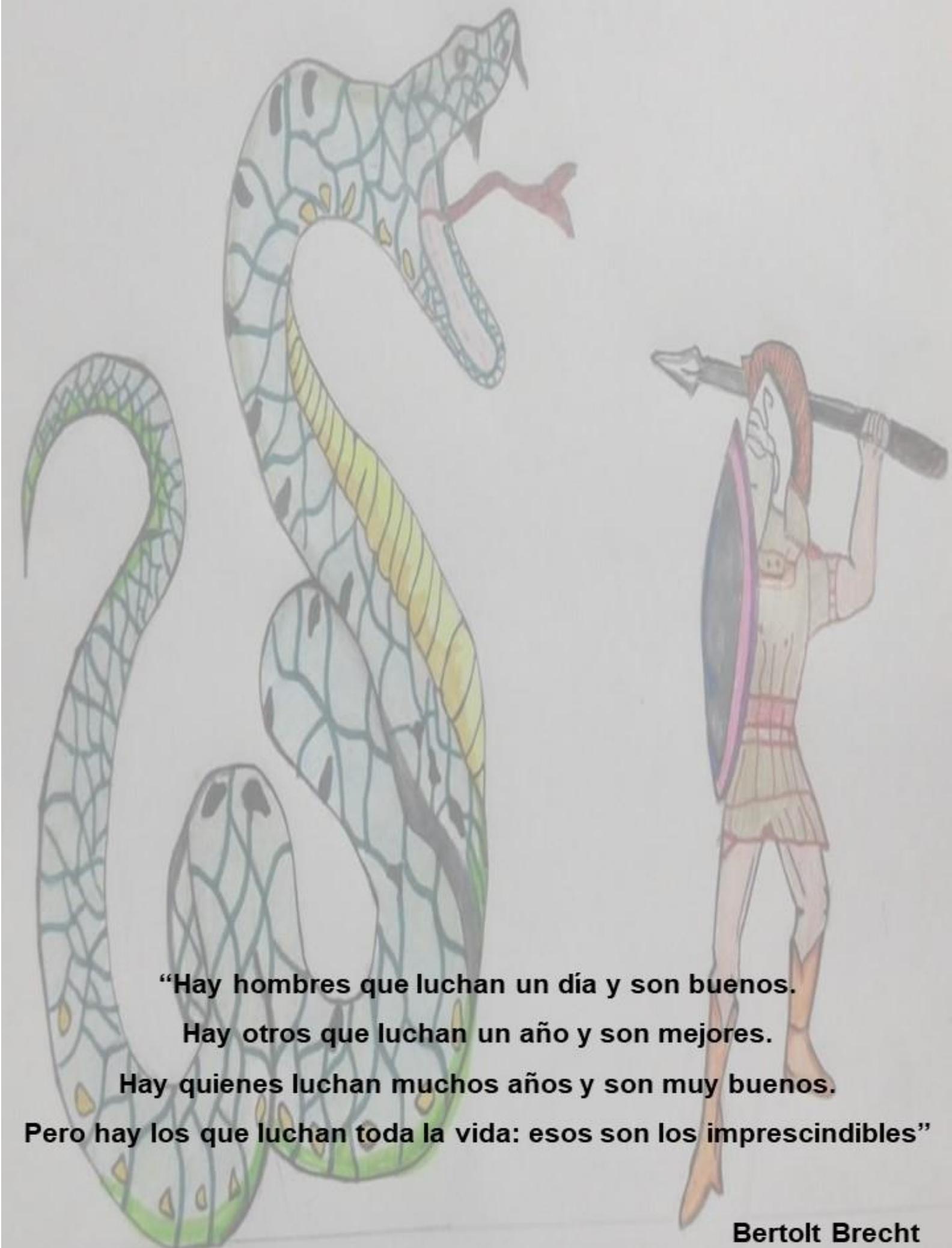
Abstract

Different stages related to the toxicokinetic processes of goethite (α -FeOOH) and magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles (NPs) were investigated in two freshwater invertebrate species: *Lumbriculus variegatus* (oligochaete) and *Biomphalaria glabrata* (gastropod). Biomarkers related to oxidative stress processes and neurotoxic effects in organisms acutely exposed (48 h) were also determined. In addition, the influence of humic substances and metallic elements (Cd and Pb) on the bioavailability of both NPs were studied.

The gastropods were able to absorb goethite NPs while *L. variegatus* did not show an actual absorption process. According to previous studies, some biomarkers linked to oxidative stress were enhanced in oligochaetes exposed to nano-goethite. Similar results were observed in *B. glabrata*, however, lipid peroxidation was not found in any species. The studied biomarkers were not affected in oligochaetes exposed to nano-magnetite. The biomarker of neurotoxic effects remained unchanged in all cases.

The simultaneous presence of humic substances modified the goethite NPs bioavailability in both species. After exposing the organisms to a binary mixture of NPs plus Cd or Pb, changes in the bioavailability were only observed for Cd and nano-goethite.

Keywords: goethite nanoparticles, magnetite nanoparticles, *Lumbriculus variegatus*, *Biomphalaria glabrata*, biomarkers parameters, oxidative stress, toxic effects.



“Hay hombres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos.

Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles”

Bertolt Brecht

Agradecimientos

En este espacio quiero agradecerles a ellos, a los imprescindibles, por haberme acompañado a lo largo de este camino.

A mis directoras Noemí y Adriana, por abrirme las puertas y darme la posibilidad de seguir creciendo en mi profesión. Por todo lo aprendido en lo profesional y en lo humano al lado de ustedes. Por supuesto que también por la paciencia que me tuvieron. Hoy salgo con más armas para enfrentar el día a día en esta profesión.

A la Dra. María del Carmen Ríos de Molina por aceptar ser mi consejero de estudios y por todos sus aportes en el ámbito científico.

A Julia y Luis, mis viejos, por estar siempre presentes, guiarme y hacerme más fácil el día a día para que hoy me encuentre en este lugar. Por supuesto, por los tupper y los asados, que ayudaron mucho con el ritmo que uno lleva.

A mi hermano Gabriel, o Gabo como le decimos, por estar al lado, siempre pendiente y dispuesto para ayudarme en todo lo que necesité. Por las horas que empeñaste en hacer que escriba mejor. Algo mejoré.

A Daissy, mi cielito, mi granito de café colombiano, por estar en todo momento al lado mío en este trayecto. Por la paciencia. Por estar siempre escuchando y aconsejando. Por ser mi compañera.

A mis tíos y primos por estar siempre al lado y dispuestos a ayudarme en todo lo necesario.

A toda la familia de Daissy por las buenas energías que siempre me enviaron desde Colombia. A Jenny por interpretar mis palabras y volcarlas en ese hermoso dibujo.

A quien más si no al Doctor Raúl F. Itria, alias el gato medieval enlatado, por esos cafés, cervezas y tragos, en donde se dieron esas charlas científicas y en donde recibí esos consejos para poder seguir en el camino. Por su empuje.

Al laboratorio de contaminantes orgánicos del Instituto Nacional de Tecnología Industrial, en donde desempeño hace aproximadamente 14 años mi carrera de

químico. Por brindarme los espacios y ayuda que necesité para poder terminar el doctorado.

A mis compañeros del labo de tóxico Julio, María Laura, Marcela, Ivana, Ornella y mis ex compañeros Naty, Silvana, Maria Luisa, Norma, por su colaboración en este trabajo, su calidez y hacer más ameno cada día.

A los amigos que siempre estuvieron presentes.

Dedicado a:

Mis viejos, Julia y Luis

Mi hermano, el Gabo y

Mi granito de café colombiano, Daissy

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en la siguiente publicación:

“Investigating the Uptake and Some Subcellular Effects of Manufactured Goethite Nanoparticles on *Lumbriculus variegatus*”

Gigena, J., Martínez, M. L., Zbihlei, G., Bozzano, P., Alonso, P. R., Cochón, A. C., y Verrengia Guerrero, N. R. (2016). *Expert Opinion on Environmental Biology*.

La puesta a punto de la determinación de la capacidad antioxidante total (TOSC) fue realizada en primer lugar sobre la lombriz de tierra *Eisenia andrei*. Los resultados fueron presentados en la siguiente publicación:

“Nanopartículas de Goethita en *Eisenia andrei*: Ingreso, Efectos Subcelulares y su Influencia en la Acumulación de Cd y Pb”

Wenzel, M. C., Gigena, J., Fuchs, J. S., Oneto, M. L., Cochón, A. C., Casabé, N. B., y Verrengia Guerrero, N. R. (2016). *Química Viva*, 15(2), 29-43.

Además, los resultados fueron divulgados en los siguientes congresos:

“Ingreso de nanopartículas de óxido férrico en invertebrados acuáticos”

Gigena, Julián; Zbihlei, Gonzalo M.; Alonso, Paula R.; Oneto, María L.; Cochón, Adriana C.; Verrengia Guerrero, Noemí R. XVIII Congreso Argentino de Toxicología (2013). *Acta Toxicológica Argentina* 21 S, 84.

“Diferencias en la incorporación de nanopartículas de goethita en tres especies de invertebrados”

Gigena, Julián; Cáceres Wenzel, Marcela I.; Fuchs, Julio; Oneto, María L.; Cochón, Adriana C.; Basack, Silvana; Casabé, Norma B.; Verrengia Guerrero, Noemí R. Congreso Iberoamericano de Toxicología. III Congreso Iberoamericano de Salud Ambiental para el Desarrollo Sustentable (2014). *Acta Toxicológica Argentina* 22 S, 43.

“Respuestas antioxidantes en dos organismos bioindicadores expuestos a nanopartículas de óxido férrico”

Cáceres Wenzel, Marcela I.; Gigena, Julián; Fuchs, Julio S.; Oneto, M. Luisa; Basack, Silvana; Cochón, Adriana C.; Verrengia Guerrero, Noemí R.; Casabé, Norma B. V Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental-SETAC Argentina (2014). <https://setacargentina.setac.org>.

“Utilidad de nanopartículas comerciales de goethita en la remediación de Cd y Pb en ambientes acuáticos y terrestres”

J. Gigena; M.I. Cáceres Wenzel; J.S. Fuchs; M.L. Oneto; N.B. Casabé; A.C. Cochón; N.R. Verrengia Guerrero. III Reunión Nanocórdoba (2014). Publicado en el libro de resúmenes, 35.

“Ingreso de nano-goethita en *B. glabrata* y su rol frente a Cd y Pb”

J. Gigena, I.L. Molena, A.C. Cochón, N.R. Verrengia Guerrero. II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, y II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental (2015). Publicado en el libro de resúmenes, 62.

“Nanopartículas de magnetita y *Lumbriculus variegatus*”

Gigena, Julián; Oneto, María L.; Cochón, Adriana C.; Verrengia Guerrero, Noemí R. XXXIV Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología (2016). Acta Toxicológica Argentina 24 S, 36-37.

“Investigación de efectos subcelulares en *Biomphalaria glabrata* por exposición a nanopartículas de goethita”

Gigena, Julián; Cochón, Adriana C.; Verrengia Guerrero, Noemí R. VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC, Capítulo Argentino (2018). <https://setacargentina.setac.org>.

Índice General

| | |
|---|-----------|
| Introducción..... | 1 |
| 1. Nanomateriales | 2 |
| 1.1. Un poco de historia..... | 4 |
| 1.2. Aplicaciones | 6 |
| 1.3. Síntesis de nanomateriales | 8 |
| 1.4. Clasificación de nanomateriales..... | 9 |
| 1.5. Fuentes de nanomateriales..... | 10 |
| 1.6. Regulaciones | 11 |
| 1.7. NPs de óxidos de hierro | 12 |
| 2. Nanotoxicidad..... | 15 |
| 2.1. Ensayos de toxicidad | 15 |
| 2.2. Calidad de aguas y suelos: Invertebrados acuáticos como especies bioindicadoras..... | 20 |
| 2.3. Toxicocinética y Toxicodinámica de nanomateriales | 24 |
| 3. Nanomateriales en sistemas acuáticos | 32 |
| Hipótesis y Objetivos..... | 39 |
| Materiales y Métodos..... | 42 |
| 4. Reactivos..... | 43 |
| 4.1. Goethita..... | 43 |
| 4.2. Magnetita | 43 |
| 4.3. Ácidos húmicos | 44 |
| 5. Cultivos de invertebrados acuáticos..... | 45 |
| 5.1. <i>Lumbriculus variegatus</i> | 46 |
| 5.2. <i>Biomphalaria glabrata</i> | 46 |
| 6. Caracterización físico-química de nanopartículas | 47 |
| 7. Bioensayos..... | 49 |
| 7.1. Análisis de Hierro | 52 |
| 7.2. Parámetros biomarcadores | 54 |
| 7.2.1. Parámetros relacionados con procesos de estrés oxidativo | 54 |
| 7.2.1.1. Superóxido dismutasa..... | 55 |

| | |
|---|------------|
| 7.2.1.2. Catalasa..... | 56 |
| 7.2.1.3. Glutatión total..... | 57 |
| 7.2.1.4. Capacidad antioxidante total..... | 58 |
| 7.2.1.5. Peroxidación lipídica | 60 |
| 7.2.2. Parámetros biomarcadores relacionados con efectos neurotóxicos | 61 |
| 7.3. Interacciones con otras sustancias químicas | 63 |
| 7.3.1. Influencia de ácidos húmicos | 64 |
| 7.3.2. Interacción con metales | 64 |
| 8. Análisis estadístico..... | 65 |
| Resultados..... | 66 |
| 9. Caracterización de nanopartículas | 67 |
| 9.1. Goethita..... | 67 |
| 9.2. Magnetita | 76 |
| 9.3. Puesta a punto de la determinación de hierro por AAS | 78 |
| 10. <i>Lumbriculus variegatus</i> | 79 |
| 10.1. Incorporación de NPs de goethita | 79 |
| 10.2. Efectos subcelulares en presencia de NPs de goethita | 80 |
| 10.3. Incorporación de NPs de magnetita | 90 |
| 10.4. Efectos subcelulares en presencia de NPs de magnetita | 90 |
| 11. <i>Biomphalaria glabrata</i> | 96 |
| 11.1. Incorporación de NPs de goethita | 96 |
| 11.2. Efectos subcelulares en presencia de NPs de goethita | 103 |
| 12. Interacción de NPs con otras sustancias presentes en el medio | 108 |
| 12.1. Ácidos húmicos (AH)..... | 108 |
| 12.2. Cadmio..... | 110 |
| 12.3. Plomo..... | 115 |
| Discusión..... | 120 |
| Conclusiones..... | 143 |
| Referencias Bibliográficas..... | 148 |

Abreviaturas

| | |
|----------------------|--|
| AAS | Espectrofotometría de absorción atómica |
| ABAP | Dihidroclorhidrato de 2-2'azo-bis(2-metilpropionamidina) |
| Ac | Área bajo la curva de la reacción control al graficar área del pico de etileno en función del tiempo |
| AChE | Acetilcolinesterasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| A_H | Área bajo la curva obtenida al graficar área del pico de etileno en función del tiempo |
| AH | Ácidos húmicos |
| APS | Espectrometría de medida de tamaño aerodinámico de partículas |
| ASC | Ascorbato |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| CAT | Catalasa |
| CNEA | Comisión Nacional de Energía Atómica |
| CVD | Deposición química en fase vapor |
| DE | Desviación estándar |
| DHA | Dehidroascorbato |
| DLS | Dispersión dinámica de la luz |
| DMO | Destrucción de la materia orgánica |
| DTNB | 5,5'-ditiobis(2-nitro-ácido benzoico) |
| ECHA | European Chemicals Agency |
| EDAX | Análisis de energía dispersiva de rayos X |
| EDTA | Ácido etilendiamintetraacético |
| FID | Detector de ionización a la llama |
| GC | Cromatografía gaseosa |
| GSH | Glutatióñ |
| HS | Espacio de cabeza |
| INTI | Instituto Nacional de Tecnología Industrial |
| ISO | International Organization for Standardization |
| ISSP | Institute for Science, Society and Policy |

| | |
|---------------|--|
| ITIS | Integrated Taxonomic Information System |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| KMBA | Ácido- α -ceto-metilbutírico |
| LD | Límite de detección |
| MDA | Malondialdehído |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NET | Negro de ericromo T |
| NMI | National Measurement Institute |
| NMs | Nanomateriales |
| NPs | Nanopartículas |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development |
| PEG | Polietilenglicol |
| PTFE | Politetrafluoretileno |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SEM | Microscopía de barrido electrónico |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARS | Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TEM | Microscopía de transmisión electrónica |
| t-GSH | Glutatión total |
| TNB | Ácido 2-nitro-5-tiobenzoico |
| TOSC | Capacidad antioxidante total |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| US EPA | United States Environmental Protection Agency |
| US FDA | United States Food and Drugs Administration |
| YTAC | Ioduro de acetiltiocolina |

Introducción

A fines de la década de 1980 y principios de la de 1990, las empresas comenzaron a producir los primeros compuestos en escala nanométrica (NNI 2017). Desde aquel entonces, el interés y el crecimiento que han alcanzado los nanomateriales, se derivan de sus peculiares propiedades físico-químicas y de la versatilidad para su empleo en múltiples campos de aplicación.

En la actualidad, se invierten cifras millonarias en investigación, desarrollo y producción de nanomateriales en todo el mundo. En el mercado ya se cuenta con miles de productos que contienen estas nuevas sustancias.

Por otro lado, a lo largo de los años, el hombre ha aprendido acerca de los problemas de contaminación y de impacto ambiental producidos por la liberación indiscriminada de sustancias químicas de origen antropogénico a los distintos compartimentos ambientales. Todos esos conocimientos son aplicables para los llamados macro-contaminantes, pero no resultan suficientemente aplicables frente a los nanomateriales, los cuales representan un nuevo desafío en el campo de la Toxicología.

1. Nanomateriales

Los nanomateriales (NMs) se pueden definir como aquellos materiales cuyo tamaño se encuentra en el rango de 1 a 100 nm en al menos una dimensión (ISO 80004:2015, Handy y col. 2008, US EPA 2007), y a las nanopartículas (NPs) como partículas con sus tres dimensiones en dicho rango (ISO 80004:2015). Con fines comparativos se puede decir que una nanopartícula tiene sus dimensiones acotadas entre las de una molécula de glucosa y el tamaño de un virus (RIVM 2015). Por consiguiente, las NPs poseen un tamaño similar al de las biomoléculas (Fig. 1), pero se diferencian de estas últimas por poseer una composición química relativamente más simple, diferentes conformaciones espaciales y distintas propiedades físico-químicas (Bystrzejewska-Piotrowska y col. 2009).

En el presente, los límites que definen a las NPs son cuestionados. Si bien el límite inferior de 1 nm se coloca para diferenciar a las NPs de grupos de pocos átomos o moléculas individuales pequeñas, el límite superior de 100 nm no es fijo (ISO 80004:2015). Por las propiedades físico-químicas que presentan, partículas con tamaños mayores a 100 nm y menores a 1000 nm pueden ser consideradas como NPs (Boverhof y col. 2015, US FDA 2014).

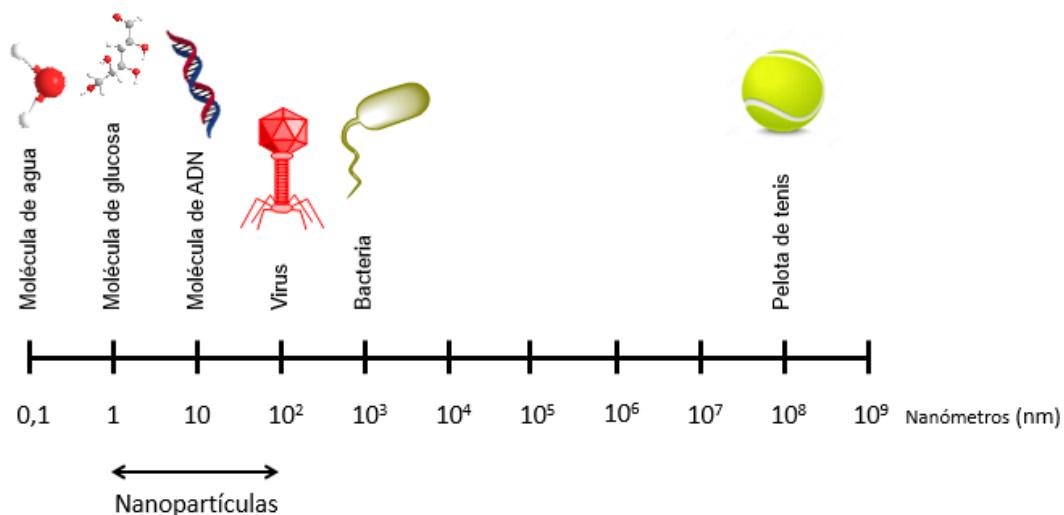


Fig. 1. Tamaño de diferentes materiales. Las NPs se encuentran entre 1 y 100 nm (adaptado de RIVM 2015).

A escala nanométrica se dan fenómenos que son regidos por las leyes de la mecánica cuántica (NNI 2017). En consecuencia, las propiedades físico-químicas de las NPs, tales como las propiedades eléctricas, magnéticas, ópticas, la actividad catalítica, la conductividad térmica y el punto de fusión, entre otras, difieren marcadamente de las propiedades que tienen las partículas de igual composición pero mayor tamaño (Jeevanandam y col. 2018, Khan y col. 2017).

Por otro lado, a medida que disminuye el tamaño de las partículas, el área superficial de las mismas aumenta (Xu y col. 2018). Esto se traduce en un aumento de átomos insaturados en superficie que le otorgan a la partícula una mayor energía superficial, que intentará disminuir reaccionando con sustancias del medio que la rodean (Xu y col. 2018). Por esta razón, las NPs presentan una

mayor reactividad que las partículas con tamaños por arriba de los nanómetros (Xu y col. 2018).

La obtención de NPs con diferentes tamaños, morfologías, composición química y propiedades, ha permitido producir materiales con características mejoradas, con respecto a materiales de mayor tamaño, para una gran cantidad de aplicaciones (Jeevanandam y col. 2018). Por esto, las NPs ocupan una importante fracción de los proyectos científicos y de desarrollo tecnológico.

1.1. Un poco de historia...

Previo a los avances tecnológicos y nuevos conceptos que se fueron introduciendo en el ámbito de la ciencia y la tecnología a partir de mediados del siglo XX, que permitieron entender los fenómenos que rigen a escala nanométrica, entre los siglos IV y XVIII ya se encontraban materiales constituidos por nanoestructuras.

Un ejemplo es la copa de Lycurgus del Siglo IV (último período de la era Romana). La misma estaba conformada por partículas de oro-plata con tamaños menores a 100 nm (Barber y Freestone 1990) que le conferían a la copa un efecto dicroico. En la Fig. 2, obtenida del Museo Británico (www.britishmuseum.org), se puede visualizar dicho efecto. Si se observa la luz reflejada, la copa toma un color verde opaco mientras que, si se observa la luz transmitida, adquiere un color rojo.



Fig. 2. Copa de Lycurgus. (a) observación de la luz reflejada. (b) observación de la luz transmitida. (www.britishmuseum.org)

Otro ejemplo son los sables de Damasco del siglo XVII que, por microscopía electrónica de alta resolución, se pudo verificar que estaban constituidos por nanocables de cementita y nanotubos de carbono (Fig. 3) (Reibold y col. 2009). La presencia de estas nanoestructuras permitió que los sables tuvieran mayor fuerza, resistencia y un filo muy particular (NNI 2016).

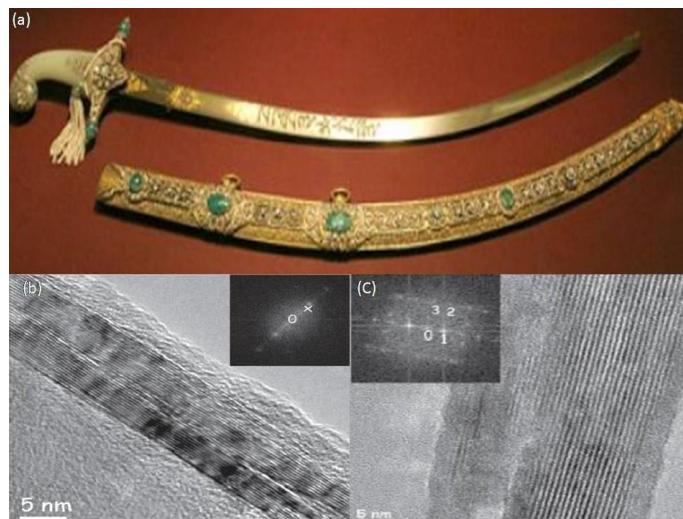


Fig. 3. (a) Sable de Damasco del siglo XVII (NNI 2016). (b) Imagen obtenida por microscopía de transmisión electrónica de los nanotubos de carbono presentes en el sable de Damasco (Reibold y col. 2009). (c) Imagen obtenida por microscopía de transmisión electrónica de los nanocables de cementita presentes en el sable de Damasco (Reibold y col. 2009).

En 1857, Michael Faraday descubre en sus estudios de interacción entre la materia y la luz, que el oro nanoparticulado presenta diferentes colores según las condiciones lumínicas (Tweney 2002).

En 1936, Erwin W. Müller inventa el microscopio de emisión, que permitía el análisis de superficies con una resolución cercana a la molecular. Luego en 1951 inventa el microscopio de campo iónico que ya permitía una resolución a escala atómica (ISSP 2014).

En 1959, en la reunión anual de la Sociedad Física Americana, en el Instituto de Tecnología de California, Richard Feynman abordó en su conferencia “There's Plenty of Room at the Bottom” la posibilidad de poder manipular y controlar materiales a escala atómica, donde las leyes que rigen (leyes de la mecánica cuántica) son diferentes a las de los materiales a una escala mayor (Feynman 1960).

Y fue en 1974 cuando el término “nanotecnología” fue citado por primera vez por el profesor Norio Taniguchi, de la Universidad de Ciencias de Tokio. Definió el término como "el procesamiento, separación, consolidación y deformación de materiales átomo por átomo, molécula por molécula" (ISSP 2014).

En 1981 Gerd Binnig y Heinrich Rohrer crearon el microscopio de efecto túnel que permite observar átomos individuales, y en 1986 Gerd Binnig, Calvin Quate, y Christoph Gerber inventaron el microscopio de fuerza atómica que permite ver y manipular materiales por debajo de la escala nanométrica (Park y Quate 1987).

1.2. Aplicaciones

Las NPs han encontrado aplicación en industrias, tales como la electrónica, la cosmética, la medicinal, la textil, la ambiental, la alimentaria, la energética, entre muchas otras (Krzyzewska y col. 2016).

En medicina, las NPs son estudiadas y aplicadas para el tratamiento de enfermedades, regeneración de tejidos, implantes, distribución de drogas,

biomarcadores luminiscentes, desinfectantes, diagnóstico por imágenes (Krzyszewska y col. 2016, Remya y col. 2015, Salata 2004).

Ambientalmente, las NPs metálicas y de óxidos metálicos son estudiadas principalmente para la remediación de sitios contaminados y para la obtención de agua para consumo humano (Hua y col. 2012, US EPA 2009, Tiwari y col 2008).

En la industria textil, por ejemplo, con el agregado de NPs metálicas o de óxidos metálicos, se busca que los productos tengan la capacidad de repeler la suciedad y el agua, posean actividad antimicrobiana y adquieran mayor resistencia (DANA 2.0 2018).

En el campo energético se busca mejorar los dispositivos de almacenamiento de energía y los procesos de combustión (Hessian Ministry of Economy, Transport, Urban and Regional Development 2008).

En electrónica, por ejemplo, las NPs son estudiadas para incorporarlas en baterías, *displays*, *chips*, dispositivos de almacenamiento y para realizar dispositivos cada vez más veloces (NNI 2017, Allsopp y col. 2007).

A partir de la década del 90, los sectores públicos y privados fueron incrementando las inversiones destinadas al campo de la nanotecnología (Kendrick y col. 2015). En el 2005, las inversiones a nivel mundial alcanzaron los 9,6 billones de dólares y nueve años después la cifra invertida superó poco más de los 18,0 billones de dólares (Lux Research 2015, Lux Research 2006).

Dentro de las NPs más importantes comercialmente se encuentran las NPs de plata, oro, cobre, dióxido de titanio, óxido de zinc y óxidos de hierro (Krzyszewska y col. 2016, Remya y col. 2015, Liu y col. 2014).

Según Vance y col. (2015), en el año 2015 se contaba con 1814 productos (producidos en 32 países), de los cuales 850 productos no advertían la presencia de NPs, aproximadamente 670 estaban conformados por NPs metálicas o de óxidos metálicos y el resto se repartía equitativamente entre nanomateriales con

carbón (tales como fullerenos, nanotubos de carbono), siliconados y otros constituidos por polímeros orgánicos.

A lo largo de los años la producción de NPs se ha ido incrementando, mejorando la calidad y rendimiento de productos y desarrollos tecnológicos. Se estima que la producción de NPs alcance las 58×10^9 toneladas para el año 2020 (Krzyszewska y col. 2016).

1.3. Síntesis de nanomateriales

Los nanomateriales (NMs) sintetizados por el hombre son obtenidos por medio de procesos químicos, físicos y biológicos, que permiten controlar el tamaño de la partícula, así como también su morfología y estructura, para una aplicación específica (Ealias y Saravanakumar 2017, Horikoshi y Serpone 2013).

Uno de los grandes problemas que se presentan al sintetizar NPs, es que éstas son termodinámicamente inestables (Xu y col. 2018). Como se mencionó anteriormente, las NPs poseen una gran área superficial y muy alta reactividad (Lead y Smith 2009). Por lo tanto, las NPs, una vez sintetizadas, podrían reaccionar generando dispersiones inestables y heterogéneas (Xu y col. 2018, Lead y Smith 2009). Estos problemas están siendo abordados con el agregado de agentes estabilizantes, tales como surfactantes, cadenas cortas de polímeros y moléculas orgánicas, que recubran a las NPs con el fin de obtener dispersiones más estables y homogéneas (Xu y col. 2018, Lead y Smith 2009).

Los procesos de síntesis pueden ser divididos en dos grandes grupos denominados “De arriba hacia abajo” (*Top down*) y “De abajo hacia arriba” (*Bottom up*).

El primero de ellos consiste en obtener los NMs partiendo del mismo material en escala macro. El proceso radica en ir refinando ese material hasta obtener partículas a escala nanométrica (Khan y col. 2017, Horikoshi y Serpone 2013, Daraio y Jin 2012, US EPA 2008). Son técnicas que se caracterizan por ser llevadas a cabo en fase sólida (Horikoshi y Serpone 2013). Dentro de este grupo

podemos encontrar técnicas litográficas y técnicas de ataque mecánico, es decir, por trituración con molinos de bolas de alta energía (Rajput 2015).

El segundo grupo de técnicas, “De abajo hacia arriba”, consiste en obtener NMs a partir de la condensación de átomos o moléculas. Los átomos o moléculas se ensamblan para dar origen al material. En términos generales las técnicas de este grupo se basan en el principio de sobresaturación (Lead y Smith 2009). Pueden realizarse en fase sólida o líquida (Horikoshi y Serpone 2013). Algunas técnicas empleadas son la condensación de gas, la deposición química en fase vapor (CVD), el método de sol-gel, la co-precipitación y la biosíntesis (Ealias y Saravanakumar 2017, Horikoshi y Serpone 2013).

1.4. Clasificación de nanomateriales

Los nanomateriales (NMs) pueden ser clasificados de diversas maneras. Una clasificación comúnmente utilizada para nanomateriales manufacturados es la basada en la estructura, en donde pueden identificarse cuatro grupos: NMs a base de carbono, NMs de base inorgánica, NMs de base orgánica y NMs de base compuesta (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008).

Los NMs a base de carbono presentan una estructura formada por enlaces de carbono. En este grupo se encuentran NMs como los nanotubos de carbono, los Fullerenos (C₆₀) , fibras de carbono y el grafeno (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008).

Los NMs de base inorgánica en general se caracterizan por contener metales en su estructura. Los puntos cuánticos, las NPs de metales u óxidos metálicos, y los semiconductores, integran este grupo (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008).

Los NMs de base orgánica están sintetizados a partir de materia orgánica. Estos NMs son sintetizados ensamblando moléculas para conseguir la estructura deseada. Dentro de este grupo encontramos miscelas, liposomas, polímeros y dendrímeros (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008).

Los NM_s de base compuesta se basan en la obtención de un material combinando varios materiales. Pueden combinarse diversas NPs orgánicas e inorgánicas o NPs con materiales de mayor escala. En este caso, al igual que los NM_s de base orgánica, se van diseñando con determinadas características de acuerdo a la aplicación deseada. (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008).

1.5. Fuentes de nanomateriales

Los NM_s pueden ser de origen natural o antropogénico (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008).

Desde los orígenes de la Tierra convivimos con diversas clases de NM_s. En la naturaleza se originan a través de diversos fenómenos, tales como erupciones volcánicas, reacciones de precipitación, por biomineralización y por biogénesis (US EPA 2008).

Las NPs de origen antropogénico pueden originarse accidentalmente o intencionalmente (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008). Las que son generadas accidentalmente son producidas en procesos de combustión o como productos no deseados en las industrias (Jeevanandam y col. 2018). Las NPs originadas intencionalmente son diseñadas con características únicas para cumplir con un propósito determinado (Jeevanandam y col. 2018, US EPA 2008).

La principal diferencia entre las NPs de origen natural y aquellas diseñadas en el laboratorio es que éstas últimas son producidas a gran escala, con propiedades específicas y homogéneas (tamaño, morfología, reactividad, etc.) (Jeevanandam y col. 2018).

Las NPs manufacturadas fueron originadas para cumplir una determinada función específica. La liberación de éstas a los suelos y a los sistemas acuáticos podría ocasionar efectos adversos sobre la biota.

Los NM_s son liberados al ambiente y pueden alcanzar los sistemas acuáticos y terrestres durante las distintas etapas de su ciclo de vida (Bundschuh y col. 2018,

Wilson 2018, Krzyzewska y col. 2016, US EPA 2014, Lead y Smith 2009). Pueden ser liberados durante la etapa de producción por derrames accidentales y a través de la descarga de efluentes residuales (Bundschuh y col. 2018, Krzyzewska y col. 2016, US EPA 2014, Lead y Smith 2009). Además, pueden ingresar al ambiente accidentalmente durante su transporte (Lead y Smith 2009). También los NM s pueden llegar a los compartimentos ambientales por su aplicación directa (caso de nanopesticidas) o a través de la eliminación de los productos de uso domiciliario y hospitalario que las contienen (Bundschuh y col. 2018, Krzyzewska y col. 2016).

Los valores de concentración de NPs que se disponen en sistemas acuáticos son obtenidos mediante sistemas computacionales de modelado (Bundschuh y col. 2018, Liu y col. 2014). Las concentraciones estimadas en cuerpos de agua según estos modelos se encuentran en el rango de los ng L^{-1} - mg L^{-1} (Bundschuh y col. 2018, Liu y col. 2014). Estas diferencias en el rango de concentración pueden deberse a las aproximaciones de cada modelo, a las NPs en estudio, al ciclo de vida de las mismas, a la cantidad producida y a las características del sistema acuático que interviene en el comportamiento de las NPs (Bundschuh y col. 2018, Liu y col. 2014).

1.6. Regulaciones

Los NM s están siendo liberados al ambiente y todavía se está lejos de alcanzar una correcta evaluación de riesgo (Wilson 2018).

En muchos países, los NM s son monitoreados utilizando las normativas y regulaciones vigentes para sustancias químicas convencionales. En países más avanzados, se toman medidas preventivas a modo de evitar los riesgos asociados a NM s y se cuenta con registros de NM s producidos (Jeevanandam y col. 2018, German environment agency 2016).

Sin embargo, a nivel mundial se concuerda que las legislaciones, reglamentaciones y normativas vigentes deben ser adaptadas y unificadas para

esta nueva clase de sustancias (German environment agency 2016). Si bien la Unión Europea está trabajando para consensuar un marco regulatorio, todavía no existe una regulación específica, como tampoco protocolos para manipulación, etiquetado, pruebas de toxicidad o evaluación de su impacto ambiental (Jeevanandam y col. 2018, German environment agency 2016).

1.7. NPs de óxidos de hierro

El hierro (Fe) es uno de los metales de transición más abundantes en el planeta Tierra (Ali y col. 2016). El Fe se encuentra en los suelos y en los sistemas acuáticos formando óxidos y oxihidróxidos (Villacís-García y col. 2015, Guo y Barnard 2013). La hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), la magnetita (Fe_3O_4) y la goethita ($\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o $\alpha\text{-FeOOH}$) son los más abundantes minerales formadores de roca (Guo y Barnard 2013). La hematita y la goethita son los más estables en el ambiente (Raiswell 2011). En términos generales, los óxidos y oxihidróxidos de Fe presentan muy baja solubilidad (Raiswell 2011).

En los sistemas acuáticos, durante el ciclo del Fe, se forman NPs de óxidos y de oxihidróxidos de Fe (Fig. 4) (Guo y Barnard 2013).

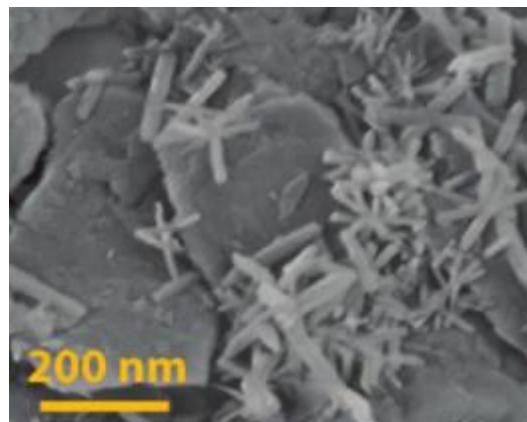


Fig. 4. Imagen obtenida por microscopía de barrido electrónico (SEM) de NPs de goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$) presentes en sedimentos alojados en un Iceberg de la Antártida (Raiswell 2011).

Como se mencionó anteriormente, las NPs de óxidos y oxihidróxidos de Fe son las más importantes comercialmente (Krzyzewska y col. 2016, Remya y col. 2015). En el año 2010 fueron sintetizadas entre 100 y 1.000 toneladas de NPs de óxidos de Fe (Bundschuh y col. 2018).

Debido a sus propiedades magnéticas y alta área superficial, que les confiere alta reactividad química, las NPs de óxidos de Fe son empleadas e investigadas en la industria cosmética y electrónica, en medicina, en catálisis y también para su aplicación en la remediación de sitios contaminados (Tirraferri 2017, Krzyzewska 2016, Remya 2015).

En cosmética son utilizadas en cremas solares (Krzyzewska y col. 2016).

En el campo de la electrónica, las NPs de óxidos de Fe son empleadas para la producción de dispositivos de almacenamiento de datos (Krzyzewska y col. 2016).

En medicina, las NPs de óxidos y oxihidróxidos de Fe se aplican y se investigan en el diagnóstico por imágenes de contraste, la distribución de drogas y como suplemento dietario (Krzyzewska y col. 2016, Remya y col. 2015). Las NPs de magnetita y de goethita son de las más utilizadas e investigadas en este campo (Remya y col. 2015).

En cuestiones ambientales, las NPs de óxidos de Fe son investigadas para la remoción de solventes clorados, compuestos orgánicos persistentes (bifenilos policlorados, pesticidas organoclorados) y metales pesados (Tirraferri y col. 2017, Krzyzewska y col. 2016, Remya y col. 2015). Particularmente, las NPs de goethita han demostrado ser muy efectivas en la adsorción de metales (Tirraferri y col. 2017, Hua y col. 2012).

La goethita es un oxihidróxido de Fe que presenta una morfología acicular (en forma de aguja) y estructura cristalina (Fig. 4 y Fig. 5) (Guo y Barnard 2013, Mäkie y col. 2011, Cornell y Schwertmann 2003). Las NPs de goethita son principalmente sintetizadas por el método químico de precipitación (Villacís-García y col. 2015). Es un método simple y eficiente, y consiste en el agregado de un álcali a una sal de Fe^{3+} en solución (Villacís-García y col. 2015).



Fig. 5. Imagen obtenida por microscopía de transmisión electrónica (TEM) de NPs de goethita de 32 nm en longitud en el eje más largo (Mäkie y col. 2011).

Los óxidos de Fe nanoparticulados con propiedades magnéticas pueden ser sintetizados a través de diferentes métodos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, los métodos químicos son los más relevantes (Ali y col. 2016). La magnetita es un óxido de Fe mixto que presenta en su composición al Fe en dos estados de oxidación, Fe^{2+} y Fe^{3+} . La magnetita presenta una estructura cristalina y, a diferencia de la goethita, una morfología octaédrica (Fig. 6) (Cornell y Schwertmann 2003). Estas NPs con propiedades magnéticas son principalmente sintetizadas empleando el método químico de co-precipitación (Ansari y col. 2017, Hua y col. 2012). El método es similar al utilizado para la síntesis de goethita, pero además de tener una sal de Fe^{3+} en solución, también tiene una sal de Fe^{2+} , que precipita junto con el Fe^{3+} (Ansari y col. 2017).

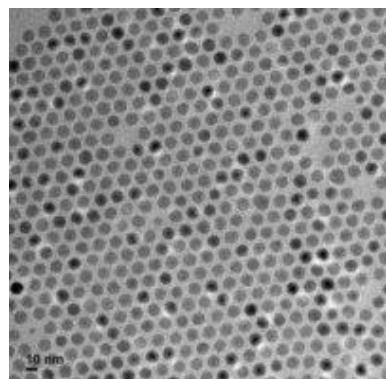


Fig. 6. Imagen obtenida por microscopía de transmisión electrónica (TEM) de NPs de magnetita de 10 nm (Sigma Aldrich 2014).

En el pasado, las NPs de óxido de Fe se consideraban no citotóxicas debido al papel fisiológico del Fe. Sin embargo, esta visión ha cambiado debido a su alta reactividad (Soenen y col. 2011). Se demostró que la goethita en suspensiones acuosas en presencia de luz y aire puede generar especies reactivas de oxígeno (Han y col. 2011). De hecho, tal como se describirá más adelante, uno de los mecanismos más comunes implicados en los efectos tóxicos de NPs metálicas y de óxidos metálicos se basa en la generación de especies reactivas de oxígeno (Baker y col. 2014, Soenen y col. 2011).

2. Nanotoxicidad

2.1. Ensayos de toxicidad

Al evaluar la toxicidad de las NPs se acepta que los efectos adversos observados dependen tanto de las propiedades físico-químicas de las mismas (tamaño, composición química, estructura, reactividad, etc.) como de las propiedades del medio de prueba (pH, salinidad, etc.) (German environment agency 2016). Por lo tanto, se debe contar con una correcta caracterización de las NPs y del medio de prueba (German environment agency 2016). Algunos autores proponen caracterizar el comportamiento de las NPs en el medio antes, durante el ensayo de toxicidad y al finalizar el mismo (Fadeel y col. 2015, Handy y col. 2012).

La situación ideal sería contar con una caracterización completa de las NPs. En muchos casos esto no es viable debido a los tiempos de análisis y a la disponibilidad de equipamiento o los costos de análisis. Sin embargo, algunos autores han recomendado determinar el tamaño, la morfología, la estructura, la composición química, la carga superficial y la solubilidad para contar con una caracterización mínima de las NPs (Fadeel y col. 2015).

Existe una diversidad de técnicas que permiten caracterizar los NMs manufacturados de forma rápida, fácil y correcta. Sin embargo, la caracterización en el medio de prueba puede dificultarse por la presencia de sólidos (suelos, sedimentos) o por tratarse de un medio acuoso heterogéneo (agua de mar, agua dulce) (Handy y col. 2012). En estos casos se deben utilizar técnicas que permitan distinguir los parámetros de las NPs sin ser obstruidos por la matriz (Handy y col. 2012).

Algunas de las técnicas utilizadas para caracterizar a las NPs son: la microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés), la difracción de electrones, el análisis de energía dispersiva de rayos X (EDAX, por sus siglas en inglés), la dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés), la determinación del potencial Z y la espectrofotometría UV-Visible.

El TEM es una de las técnicas más utilizadas que permiten conocer el tamaño y la morfología de las NPs (Mourdikoudis y col 2018). Dentro de las técnicas de microscopía, el TEM es el que permite observar la muestra con mayor aumento, aunque las imágenes obtenidas son bidimensionales (Handy y col. 2012).

En el TEM, un haz de electrones es generado y dirigido hacia una fina lámina de muestra que se encuentra depositada sobre una grilla. Al interaccionar el haz de electrones con la muestra, parte de los electrones son transmitidos. Éstos son los que permiten obtener información sobre la morfología y tamaño de las partículas presentes en la muestra (Mourdikoudis y col. 2018, Handy y col. 2012). Esta técnica permite obtener mejores resultados con NMs densos en electrones, por ejemplo, con NPs metálicas o de óxidos metálicos (Handy y col. 2012).

El análisis de difracción de electrones es una técnica útil para conocer la estructura cristalina de las NPs (Mourdikoudis y col. 2018, Handy y col. 2012). Es una técnica de microscopía que comúnmente se puede realizar por TEM (Mourdikoudis y col. 2018, Handy y col. 2012) . Al incidir el haz de electrones sobre una muestra cristalina, parte de los electrones son difractados (Mourdikoudis y col. 2018). El patrón de difracción generado por la muestra permite conocer la estructura cristalina de la misma (Mourdikoudis y col. 2018, Handy y col. 2012).

Por otro lado, el TEM puede contar con un detector de energía dispersiva de rayos X (EDAX) que permite conocer la composición de las NPs. La técnica se basa en excitar electrones de las capas internas de los átomos que, cuando vuelven a caer en los orbitales internos, liberan energía de rayos X que es capturada por el detector (Handy y col. 2012). Esa energía liberada es característica de un determinado elemento.

La técnica DLS es empleada para determinar el tamaño de NPs (Mourdikoudis y col. 2018, Handy y col. 2012, Pal y col. 2011). Es una técnica rápida, precisa y simple de emplear (Mourdikoudis y col. 2018, Lead y Smith 2009). El diámetro hidrodinámico de las NPs se obtiene a través de la ecuación de Stokes-Einstein. Dicha ecuación relaciona el diámetro con la luz dispersada, la cual fluctúa por el movimiento browniano de las partículas en suspensión (Mourdikoudis y col. 2018, Lead y Smith 2009). El cálculo del diámetro hidrodinámico parte del supuesto de que las NPs son esféricas (Mourdikoudis y col. 2018, Lead y Smith 2009). Sin embargo, las ecuaciones pueden modificarse para los casos en que las NPs no sean esféricas (Handy y col. 2012).

El valor de polidispersión también es obtenido junto al diámetro hidrodinámico de las NPs. Este valor da una idea de la heterogeneidad del tamaño de la partícula en la suspensión (Lead y Smith 2009).

Esta técnica también es utilizada para identificar la formación de agregados (Mourdikoudis y col. 2018).

El equipo utilizado para la determinación del tamaño de partículas empleando la técnica de DLS, permite obtener el valor de potencial Z. Este valor se relaciona con la estabilidad de las NPs en una suspensión (Pal y col. 2011, Lead y Smith 2009). Es una medida indirecta de la carga superficial de las NPs (Pal y col. 2011). El potencial Z puede ser calculado empleando una celda especial que contiene dos electrodos (Handy y col. 2012). Al aplicar un campo eléctrico se puede conocer la movilidad electroforética de las partículas, la cual está relacionada con el valor de potencial Z (Lead y Smith 2009).

Se considera que valores de potencial Z mayores a 30 mV o inferiores a -30 mV corresponden a suspensiones estables. Valores de potencial Z entre 30 y -30 mV corresponden a suspensiones inestables (Lead y Smith 2009).

La espectrofotometría UV-Visible es una técnica fácil de implementar y de bajo costo (Mourdikoudis y col. 2018). Se vale de las propiedades ópticas de las NPs para obtener información de las mismas (Mourdikoudis y col. 2018). Es una técnica útil para conocer la estabilidad de una suspensión (Mourdikoudis y col. 2018).

Uno de los puntos controversiales a la hora de realizar los ensayos de toxicidad, es la expresión de la dosis (Skjolding y col. 2016, Liu y col. 2014). Para las sustancias químicas convencionales solubles, se utiliza la masa como medida de dosificación (German environment agency 2016, Schmid y Stoeger 2016). Sin embargo, si expresamos en masa la dosis de un material particulado insoluble, podemos observar que, para la misma cantidad de masa, el número de NPs puede variar apreciablemente dependiendo del tamaño de las mismas (Fig. 7). Por lo tanto, una de las propuestas a la hora de realizar la dosificación, es expresarla en función del número de partículas (German environment agency 2016, Schmid y Stoeger 2016). Por otro lado, se ha sugerido que la mejor manera de expresar la dosis es en función del área superficial de las NPs (Liu y col. 2014). Como se mencionó anteriormente, una de las principales propiedades de las NPs es que presentan una mayor área superficial con respecto al material no nano y, por consiguiente, tienden a tener alta reactividad para interactuar con tejidos biológicos (Schmid y Stoeger 2016).

Para una misma cantidad de masa, asumiendo partículas esféricas, según sea su tamaño, el número de partículas varía considerablemente:

**Si el tamaño es = 2 μm — $2,4 \times 10^4$ partículas
= 20 nm — $2,4 \times 10^{10}$ partículas
= 2 nm — $2,4 \times 10^{13}$ partículas**

Fig. 7. Variación del número de partículas en función del tamaño de las mismas, asumiendo NPs esféricas para una misma cantidad de masa.

Si bien el número de partículas y el área superficial parecen más apropiadas para la expresión de la dosis, todavía el número de estudios reportados que las utilizan son escasos (Fard y col. 2015).

Otro inconveniente que se presenta a la hora de dosificar es el tratamiento de la suspensión madre (Crane y col. 2008). La agregación de las NPs puede influir en la toxicidad de las mismas y, en consecuencia, derivar en interpretaciones erróneas de los resultados observados (Crane y col. 2008). Se han propuesto diversas soluciones a este problema: el agregado de agentes químicos dispersantes a la suspensión madre y la sonicación o la agitación de la suspensión madre (Crane y col. 2008). El problema que existe con el agregado de dispersantes es que podrían ser tóxicos para los organismos de estudio (Crane y col. 2008). La sonicación o la agitación de la suspensión madre no tienen ese problema, sin embargo, los procesos para obtener suspensiones estables y homogéneas son prolongados (Crane y col. 2008).

Los ensayos de toxicidad pueden ser divididos en ensayos *in vivo* y ensayos *in vitro*.

En general, los ensayos *in vitro* son utilizados para evaluar citotoxicidad de NPs (integridad de membrana, actividad metabólica de células) (Fard y col. 2015). Al

realizarlos se debe tener especial cuidado no sólo con los problemas mencionados anteriormente, sino también con aquellos derivados de la presencia del medio de cultivo. Éste contiene nutrientes y agentes químicos que pueden interaccionar con las NPs. Estas interacciones pueden cambiar tanto la disponibilidad de nutrientes como la de las NPs. La desventaja de estos ensayos es que no contienen información de los procesos toxicocinéticos. Por esta razón, es necesario continuar con los ensayos *in vivo* que permiten obtener información sobre la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación de las sustancias en estudio (Fard y col. 2015, Deloid y col. 2014).

2.2. Calidad de aguas y suelos: Invertebrados acuáticos como especies bioindicadoras

Lumbriculus variegatus, también conocida como lombriz negra de California, es un invertebrado dulceacuícola del filo Anélida, subclase Oligochaeta, orden Lumbriculida y familia Lumbriculidae (Fig. 8) (Drewes 2018a). Estos oligoquetos se encuentran ampliamente distribuidos en el hemisferio Norte, particularmente en toda América del Norte y en regiones de Europa y Asia (Drewes 2018a). Es una especie bentónica que habita sobre el lecho de los sistemas acuáticos. Comúnmente se los puede encontrar en sedimentos limosos y arenosos de lagos, ríos, estanques y pantanos (US EPA 1990). Los principales microhábitats son troncos sumergidos en descomposición, hojas en descomposición y la base de la vegetación emergente (Drewes 2018a).



Fig. 8. *Lumbriculus variegatus* (Alchetron 2019b)

Estos oligoquetos son hermafroditas. En la naturaleza la reproducción sexual puede producirse a través del intercambio de esperma, aunque es raro que esto ocurra (Drewes 2018a). En general, se considera que en la naturaleza y siempre en los cultivos de laboratorio, la reproducción es asexual y tiene lugar a través de un proceso denominado arquitomía (Drewes 2018a, US EPA 1990). Este proceso de reproducción consiste en la fragmentación del individuo y la regeneración del fragmento faltante, el cual puede ser la cabeza, la cola, o ambos extremos (Drewes 2018a, US EPA 1990). En los sistemas acuáticos naturales, los oligoquetos pueden alcanzar una longitud de 10 cm y aproximadamente 1,5 mm de diámetro, mientras que en cultivos de laboratorio usualmente alcanzan longitudes de aproximadamente 4 a 6 cm (Drewes 2018a).

El intercambio respiratorio en los oligoquetos ocurre por medio de la cola. Cuando les resulta posible, ubican la cola por encima de los sedimentos en un ángulo recto, para disminuir la tensión superficial, y así favorecer el intercambio gaseoso con el vaso sanguíneo dorsal ubicado debajo de la epidermis (Drewes 2018a). El color rojo de los oligoquetos se debe a un pigmento similar a la hemoglobina, la eritrocruorina (Drewes 2018a). Esta última es una proteína

transportadora de oxígeno con un peso molecular de $3,6 \times 10^6$ Dalton (Royer y col. 2006).

Para alimentarse generan con la cabeza un canal en los sedimentos, mientras que la cola se extiende por fuera de los mismos (Drewes 2018a). Se alimentan de residuos de vegetación y microorganismos en descomposición (Drewes 2018a). Además, son capaces de ingerir partículas presentes en los sedimentos, por lo tanto, están expuestos a sustancias unidas a las mismas (OECD 2007, US EPA 1990). Sin embargo, no es la única ruta de ingreso de sustancias que presentan. También pueden hacerlo a través del agua de poro o por medio del agua que se encuentra por encima de los sedimentos (OECD 2007, US EPA 1990).

Debido a la exposición a sustancias a través de todas las posibles vías de ingreso, a la relevancia de estos oligoquetos en la cadena alimentaria acuática, ya que son presa de otros organismos, y además a la facilidad de cultivar y mantener en condiciones de laboratorio, son considerados por diferentes agencias internacionales como especie bioindicadora para los bioensayos de evaluación de calidad de aguas y sedimentos (ASTM 2010, OECD 2007, US EPA 1990). Incluso, se ha propuesto también su uso como organismo experimental para evaluar la toxicidad de los nanomateriales (ECHA 2017).

Los organismos de la especie *Biomphalaria glabrata* son invertebrados dulceacuícolas del filo Mollusca, clase Gastropoda, orden Basommatophora, familia Planorbidae (Fig. 9) (ITIS 2018). Se encuentran ampliamente distribuidos en zonas tropicales y subtropicales, particularmente en América se extienden desde las Antillas hasta el Sur de Brasil (Toledo y Fried 2011). A diferencia de los oligoquetos, estos gasterópodos habitan en la columna de agua de lagunas, arroyos y pantanos, a una profundidad no mayor a los 10 m aproximadamente (Jurberg y col. 1997).

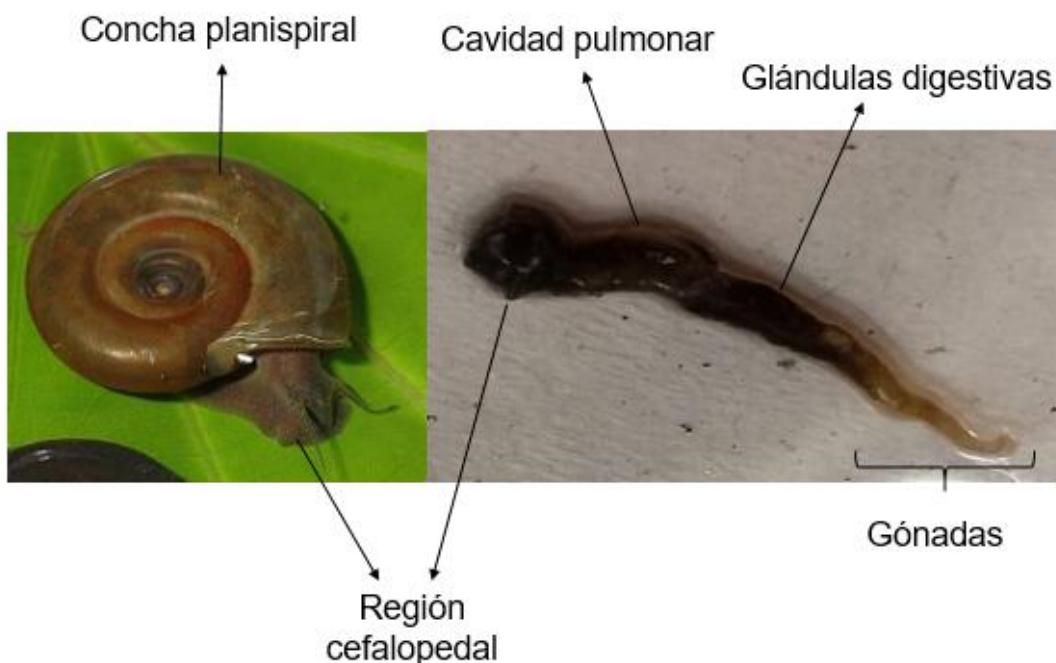


Fig. 9. *Biomphalaria glabrata* (Alchetron 2018a)

Al igual que los oligoquetos, son hermafroditas. Pueden autofecundarse, aunque la fertilización en forma cruzada es el proceso más frecuente (Toledo y Fried 2011). Los gasterópodos adultos pueden alcanzar un diámetro de concha entre 1 a 3 cm aproximadamente (De Freitas Tallarico y col. 2016, Toledo y Fried 2011). En la naturaleza pueden vivir entre 12 y 18 meses, sin embargo, en condiciones de laboratorio su tiempo de vida puede ser menor (Toledo y Fried 2011).

En cuanto a la respiración, los gasterópodos se diferencian de los oligoquetos por ser pulmonados, por lo tanto, deben salir a la superficie para respirar (Jurberg y col. 1997). En la superficie toman el aire a través de un orificio llamado neumostoma y así llenan de aire la cavidad pulmonar ubicada en el manto. La burbuja de aire formada, además de funcionar como depósito de oxígeno, permite que los gasterópodos floten con mayor facilidad (Jurberg y col. 1997). Al tener la necesidad de salir a la superficie a respirar aire, esta vía de exposición, a diferencia de los oligoquetos, no está disponible para el ingreso de sustancias químicas presentes en el medio acuoso del bioensayo.

En cuanto al transporte de oxígeno, al igual que en los oligoquetos, la eritrocruorina es la proteína encargada de cumplir ese rol (Wilbur 1983).

Los gasterópodos son herbívoros. En su hábitat natural, los organismos se alimentan de algas y de las partes blandas de plantas vasculares acuáticas.

En la actualidad, no existen protocolos estandarizados que utilicen gasterópodos de aguas dulces en los programas de evaluación de riesgo ambiental. Sin embargo, gasterópodos, incluidos los del género *Biomphalaria*, están siendo evaluados para ser incorporados como organismos bioindicadores para ensayos de toxicidad (De Freitas Tallarico y col. 2016).

Además, la especie *Biomphalaria glabrata* es recomendada por diferentes autores para ser utilizada como organismo bioindicador no sólo por estar ampliamente distribuida y ser fáciles de cultivar y mantener en condiciones de laboratorio, sino que además, es bien conocida la fisiología e incluso la secuencia del genoma, debido a la relevancia de esta especie en la salud humana, ya que son hospedadores del parásito *Schistosoma mansoni*, el cual provoca Schistosomiasis en el hombre (De Freitas Tallarico y col. 2016, Kaur y col. 2016).

2.3. Toxicocinética y Toxicodinámica de nanomateriales

Las NPs pueden ingresar a los organismos a través de la vía respiratoria, el tracto gastrointestinal y los epitelios. Una vez incorporadas en el organismo, las NPs podrían ingresar a las células y causar efectos adversos (Beddoes y col. 2015).

La endocitosis es uno de los mecanismos utilizados por las células para internalizar moléculas de gran tamaño (Beddoes y col. 2015). Los principales procesos son: la fagocitosis, la pinocitosis, la endocitosis mediada por clatrina y la endocitosis mediada por caveolina (Beddoes y col. 2015).

La fagocitosis se verifica a través de células del sistema inmune denominadas fagocitos (Gordon 2016, Beddoes y col. 2015). Estos últimos reconocen cuerpos extraños y son capaces de captarlos y encerrarlos en vesículas formadas por la membrana plasmática (Gordon 2016, Beddoes y col. 2015). Las vesículas son internalizadas para su posterior digestión por medio de los lisosomas (Gordon 2016, Beddoes y col. 2015). Las vesículas pueden encerrar cuerpos extraños con tamaños menores a 500 nm (Gordon 2016, Beddoes y col. 2015).

La pinocitosis es el mecanismo que permite internalizar en las células fluidos, conteniendo sales y moléculas disueltas que resulten esenciales para las mismas (Beddoes y col. 2015). El ingreso a las células ocurre a través de vesículas que pueden tener tamaños entre 0,5 y 5 µm (Beddoes y col. 2015).

La endocitosis mediada por clatrina se encuentra presente en todas las clases de células. A través de este mecanismo son incorporados los nutrientes como, por ejemplo, las lipoproteínas de baja densidad. La formación de la vesícula es un proceso de varias etapas en donde intervienen más de cincuenta proteínas, siendo la clatrina una proteína que es utilizada como molde para la formación de vesículas altamente curvadas (Mcpherson y col. 2018). Estas vesículas pueden alcanzar tamaños entre 100 y 120 nm (Beddoes et al. 2015).

En el mecanismo de endocitosis mediada por la caveolina, esta última se integra a la membrana plasmática favoreciendo la curvatura de las vesículas, las cuales pueden alcanzar tamaños entre 60 y 80 nm (Beddoes y col. 2015).

Se considera que el mecanismo citotóxico más importante que inducen las NPs en general, es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que pueden derivar en procesos de estrés oxidativo (Jeevanandam y col. 2018, Vale y col. 2016, Soenen y col. 2011). Normalmente, las ROS son generadas en el organismo en concentraciones que son neutralizadas por las defensas antioxidantes presentes para mantener el estado redox celular (Regoli 2000). Cuando las defensas antioxidantes son superadas por una excesiva producción de ROS, se produce un desbalance del estado redox celular, lo que deriva en estrés oxidativo, provocando daño celular a través de la peroxidación de lípidos de membrana celular, alteración del ADN, alteración

de proteínas y/o inactivación enzimática (Jeevanandam y col. 2018, Vale y col. 2016, Regoli 2000, Regoli y Winston 1999).

Las ROS derivan de la reducción del oxígeno y pueden ser o no, radicales libres. Dentro de este grupo podemos encontrar especies tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^-), los radicales peroxilos (ROO') y el oxígeno singulete (1O_2) (Nonell y Flors 2016).

El O_2^- se genera por la reducción del O_2 mediada por varias enzimas oxidadas tales como, la xantina oxidasa y la ciclooxigenasa. Además, puede formarse en la cadena respiratoria durante la fosforilación oxidativa (Pisoschi y Pop 2015). También se genera una gran cantidad de O_2^- durante la fagocitosis (Abele y col. 2012). El O_2^- es un nucleófilo y puede reaccionar con moléculas que presenten sitios cargados positivamente. Debido a su poder oxidante puede aceptar átomos de hidrógeno de agentes reductores tales como el ascorbato y el tocoferol (Pisoschi y Pop 2015).

El H_2O_2 se produce por la dismutación del O_2^- . También puede formarse directamente por acción de oxidases por medio de la transferencia de dos electrones al O_2 (Pisoschi y Pop 2015, Kohen y Nyska 2002). El H_2O_2 es nocivo debido a su poder oxidante. Puede degradar los grupos hemo de las proteínas, inactivar enzimas, actuar sobre lípidos y oxidar al ADN. Además, es nocivo por su capacidad de producir ROS más tóxicas tales como el radical OH^- (Kohen y Nyska 2002).

El OH^- se caracteriza por tener un tiempo de vida media muy corto y ser altamente reactivo. Debido a su gran poder oxidante puede actuar sobre el ADN, proteínas y lípidos (Kohen y Nyska 2002). Estos radicales son generados principalmente a través de dos reacciones. La primera consiste en la oxidación del anión superóxido y la reducción de un metal y la segunda en la descomposición del peróxido de hidrógeno catalizada por un metal de transición, como el Fe. Estas reacciones son conocidas como la reacción de Haber-Weiss y la de Fenton, respectivamente (Abele y col 2012).

Los ROO[·] son generados por una reacción que involucra tres etapas: la iniciación, la propagación y la finalización. En la etapa de iniciación se producen radicales a partir de un agente oxidante que es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de un agente reductor. En la etapa de propagación se forma un nuevo radical a partir de la reacción entre el radical obtenido en la etapa de iniciación y una molécula. Por último, en la etapa de finalización dos radicales reaccionan entre sí para formar un compuesto estable (Corrales y Muñoz Ariza 2012). Por medio de estas reacciones, por ejemplo, se forman los ROO[·] de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular y en consecuencia, esta última pierde toda su integridad (Nonell y Flors 2016).

El ¹O₂ es un estado excitado de la molécula de oxígeno. Se genera por la absorción de energía por la molécula de oxígeno en estado triplete (³O₂), que da lugar al cambio de spin de uno de los electrones desapareados de los orbitales π^* 2p. La capacidad oxidante del ¹O₂ es mucho mayor que la del ³O₂ (Nonell y Flors 2016).

Como se mencionó anteriormente, existen defensas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas, capaces de neutralizar las ROS. Dentro de las principales defensas antioxidantes enzimáticas se encuentran la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la enzima catalasa (CAT).

La enzima SOD es una metaloenzima presente en cuatro isoformas, que interviene en la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (Fig. 10) (Patlevič y col. 2016, Corrales y Muñoz Ariza 2012). Se encuentra presente en la mitocondria, en los peroxisomas, en el citosol, en los lisosomas y en el espacio extracelular (Patlevič y col. 2016).

La enzima CAT interviene en la descomposición del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno (Fig. 10) (Kohen y Nyska 2002). Es una hemoproteína que se encuentra en los peroxisomas y en las mitocondrias (Patlevič et al. 2016, Corrales y Muñoz Ariza 2012).

Por otro lado, dentro de los agentes antioxidantes no enzimáticos se encuentra el glutatión (GSH). Usualmente, éste es el antioxidante más abundante en las células (Patlevič y col. 2016, Abele y col. 2012).

El GSH es un tripéptido formado por los aminoácidos glutámico, cisteína y glicina. Es un donante de electrones que interviene en diferentes etapas de neutralización de ROS, actuando directamente sobre el OH⁻ o indirectamente como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa que interviene en la neutralización del H₂O₂ y de ROO⁻ (Fig. 10) (Abele y col. 2012, Kohen y Nyska 2002).

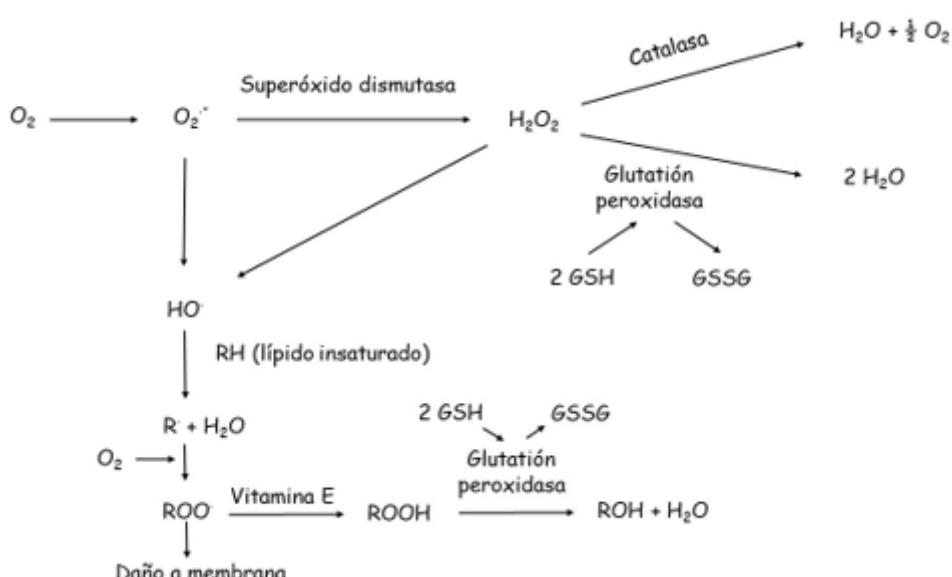


Fig. 10. Esquema simplificado de la intervención de algunas defensas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas para neutralizar ROS.

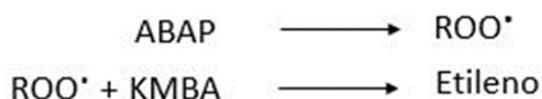
La determinación de las actividades enzimáticas, así como la de agentes antioxidantes no enzimáticos, es la forma clásica de abordar los estudios de estrés oxidativo y son útiles para alertar sobre posibles efectos adversos causados por contaminantes. Sin embargo, no son medidas que permitan conocer la capacidad total del organismo para hacer frente a una determinada carga de ROS (Regoli 2000).

Para esto, Regoli y Winston (1998), reportaron un método de análisis que permite conocer la capacidad total de la que dispone un organismo o tejido, el cual se denomina “Capacidad antioxidante total” (TOSC, por sus siglas en inglés).

El método se basa en la generación de radicales *in situ* y la reacción de éstos con el ácido α -ceto- γ -metilbutírico (KMBA) para producir etileno gaseoso, el cual es determinado empleando la técnica de espacio-cabeza - cromatografía gaseosa con detector de ionización a la llama (HS-GC-FID) (Abele y col. 2012, Regoli y Winston 1998).

Los radicales peroxilos son generados a 35 °C por descomposición térmica del dihidroclorhidrato de 2-2'-azo-bis-(2-metilpropionamidina) (ABAP); y los radicales hidroxilos, por una reacción entre el Fe quelado por EDTA y el ácido ascórbico (Fig. 11) (Abele y col. 2012).

Generación de radicales peroxilos y formación de etileno



Generación de radicales hidroxilos y formación de etileno

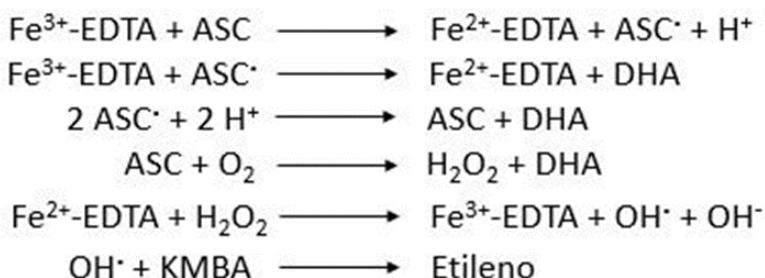


Fig. 11. Generación de radicales peroxilos e hidroxilos *in situ* y formación de etileno producida por la reacción de radicales con el KMBA (adaptado de Abele y col. 2012). **KMBA:** ácido α -ceto- γ -metilbutírico. **ABAP:** 2-2'-azo-bis-(2-metilpropionamidina). **ASC:** ascorbato. **DHA:** dehidroascorbato.

La cuantificación de TOSC se basa en monitorear la formación de etileno en función del tiempo tanto para una reacción control (en ausencia de agentes antioxidantes), donde se obtiene la máxima generación de etileno, como para

una reacción con muestra (con agentes antioxidantes), donde la formación de etileno sería menor por la capacidad de los antioxidantes de neutralizar los radicales generados *in situ* (Fig. 12) (Abele y col. 2012, Regoli y Winston 1998).

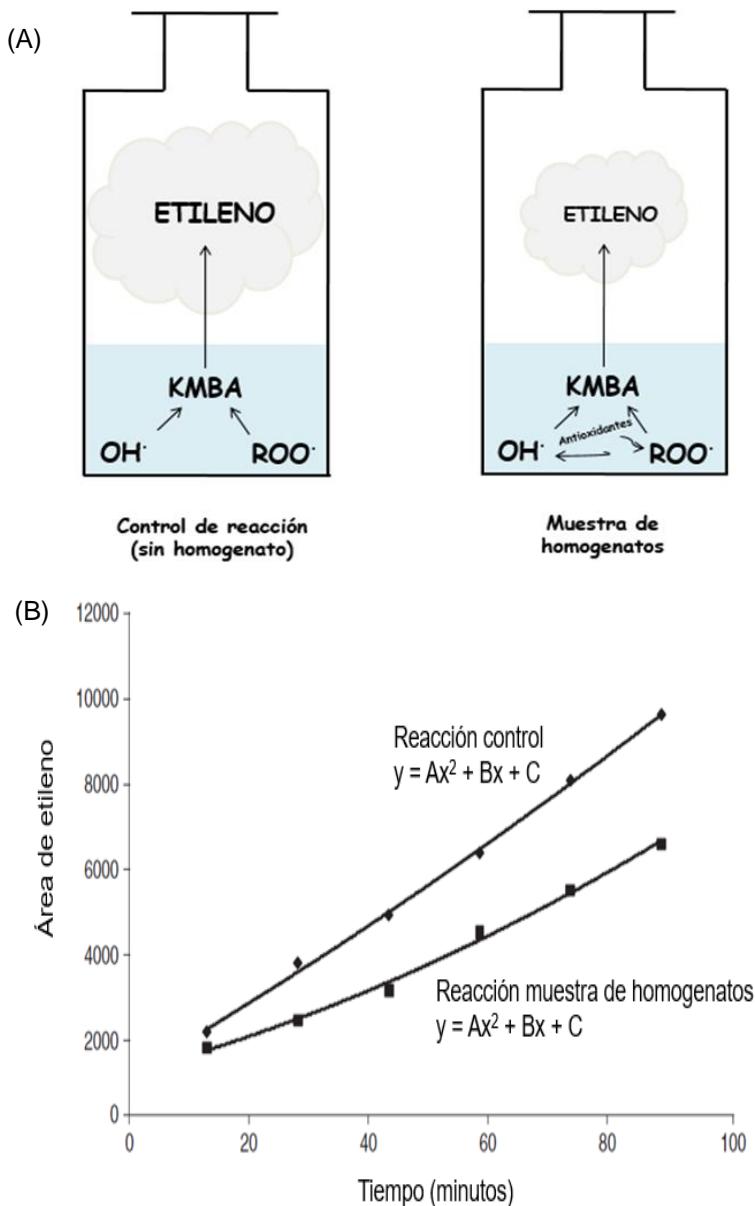


Fig. 12. (A) Generación de etileno en ausencia de antioxidantes (sin homogenato) y en presencia de muestra de homogenatos con capacidad antioxidante. **(B)** Formación de etileno en función del tiempo para la reacción control y para la reacción muestra de homogenatos (adaptado de Abele y col. 2012).

Luego, el valor de TOSC porcentual de la muestra se calcula en relación a la reacción control empleando la ecuación 1 (Abele y col. 2012).

$$TOSC\% = 100 - 100 \times \frac{A_H}{A_C}$$

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del valor de TOSC porcentual. A_H : área bajo la curva obtenida al graficar área del pico de etileno en función del tiempo. A_C : área bajo la curva de la reacción control al gráficar área del pico de etileno en función del tiempo.

Por otro lado, todavía es escasa la información acerca de la neurotoxicidad de las NPs (Lovisolo y col. 2018). Se ha demostrado que determinadas NPs, una vez incorporadas en los organismos, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica pudiendo ocasionar daños en el sistema nervioso central (Lovisolo y col. 2018, Xiaoli y Longquan 2018).

La enzima acetilcolinesterasa (AChE, por sus siglas en inglés) es considerada un parámetro biomarcador de neurotoxicidad. La determinación de la actividad de la enzima es útil para detectar la exposición a pesticidas organofosforados y carbamatos, ya que estas sustancias son capaces de inhibir a la enzima (Klaassen y Amdur 2013, Sánchez-Chávez y Salceda 2008).

La enzima AChE es una esterasa que pertenece al grupo de enzimas denominado colinesterasas (Klaassen y Amdur 2013, Sánchez-Chávez y Salceda 2008). Se ha reportado su presencia tanto en invertebrados como en vertebrados (Sánchez-Chávez y Salceda 2008). Se encuentra en la mayoría de los tejidos, pero los niveles más altos pueden encontrarse en cerebro y músculos (Klaassen y Amdur 2013). Esta enzima se localiza en el espacio sináptico y su función principal es finalizar la actividad del neurotransmisor acetilcolina, hidrolizándolo a acetato y colina (Klaassen y Amdur 2013, Sánchez-Chávez y Salceda 2008). La inhibición de la enzima provoca una acumulación del neurotransmisor en los receptores muscarínicos y nicotínicos postsinápticos,

provocando efectos adversos como broncoespasmos, cólico abdominal, calambres, parálisis, ataxia y depresión respiratoria (Fernandez y col. 2010).

La determinación de la actividad de la enzima en organismos acuáticos expuestos a NPs ha sido escasamente investigada. En dichos trabajos se han encontrado resultados contrapuestos. Los primeros reportes, mediante estudios *in vitro*, han documentado que diversas clases de NPs (de metales, óxidos metálicos y de carbono) fueron capaces de inhibir a esta enzima (Wang y col., 2009). En ejemplares de *Daphnia magna* expuestos a NPs de Cu o Cr, la inhibición de AChE se correlacionó positivamente con la concentración y el tiempo de exposición (Lu y col. 2017). En cambio, la actividad de esta enzima resultó aumentada en branquias y glándula digestiva de una especie de bivalvo marino, *Chlamys farreri*, por exposición a NPs de TiO₂ (Xia y col. 2017).

3. Nanomateriales en sistemas acuáticos

Cuando las NPs de origen antropogénico son incorporadas a los sistemas acuáticos, pueden distribuirse en los diferentes compartimentos:

- Fase acuosa soluble: es aquella que se obtiene al filtrar una muestra por una membrana con tamaño de poro de 0,45 µm.
- Material particulado suspendido: es aquel que queda retenido en la membrana luego de filtrar con un tamaño de poro de 0,45 µm.
- Sedimentos del lecho: constituido por material particulado de diferentes tamaños y composición. Entre las partículas encontramos una fase acuosa denominada agua de poro o agua intersticial. En los sedimentos encontramos compuestos inorgánicos, orgánicos y microorganismos.

En los cuerpos de agua las NPs pueden experimentar procesos de transformación, los cuales condicionarán el destino, la biodisponibilidad y la toxicidad de las mismas (Bundschuh y col. 2018). Los procesos de transformación dependerán de las propiedades de las NPs (tamaño, morfología, estructura, área superficial, etc.) y de las características del medio (pH, fuerza

iónica, materia orgánica, etc.) (German environment agency 2016). Entre los procesos de transformación que pueden experimentar las NPs se encuentran las reacciones de dilución, de óxido-reducción, de agregación, de aglomeración, de complejación y de adsorción (Fig. 13) (Bundschuh y col. 2018, German environment agency 2016, Vale y col. 2016, Peijnenburg y col. 2015).

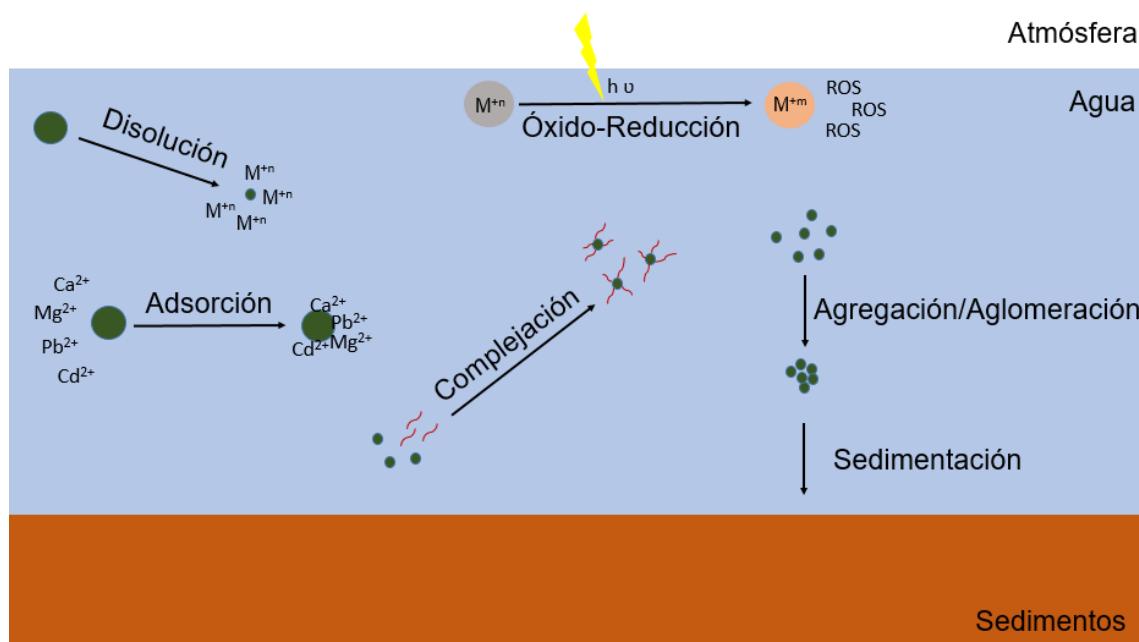


Fig. 13. Procesos de transformación de NPs antropogénicas en sistemas acuáticos (adaptado de Vale y col. 2016).

La disolución es una de las principales reacciones que afecta tanto a NPs metálicas como a las de óxidos metálicos (Vale y col. 2016). A través de esta reacción pueden ser liberados metales tóxicos al ambiente o puede disminuir la reactividad haciéndolas menos tóxicas (Vale y col. 2016).

Por medio de reacciones de óxido-reducción, las NPs pueden modificar su estado redox y por lo tanto podrían afectar tanto sus propiedades como su toxicidad (Peijnenburg y col. 2015). Se ha demostrado que algunas NPs en presencia de luz, además de modificar su estado redox, son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (Vale y col. 2016, Peijnenburg y col. 2015).

La aglomeración y la agregación de las NPs son dos procesos importantes que pueden modificar la estabilidad de las mismas en suspensión (Bundschuh y col. 2018, German environment agency 2016).

Las NPs presentan una gran área superficial que les confiere una alta reactividad, de manera que es posible que reaccionen entre sí. Debido a esto, las NPs individuales pueden unirse por medio de fuerzas electrostáticas, formando partículas de mayor tamaño (German environment agency 2016). Este proceso de unión se denomina aglomeración (German environment agency 2016). Si las NPs individuales se unen por medio de interacciones de Van der Waals, el proceso es denominado agregación (Peijnenburg y col. 2015). Dependiendo del estado de agregación o aglomeración, las NPs podrían sedimentar (German environment agency 2016).

Ambos procesos pueden ocurrir entre NPs iguales, entre diferentes NPs, y entre NPs y otras sustancias presentes en el medio (Bundschuh y col. 2018).

En los cuerpos de agua podemos encontrar ligandos orgánicos e inorgánicos, de origen natural o antropogénico, que son capaces de interaccionar con las NPs para dar lugar a la formación de complejos estables en la fase acuosa. Por ejemplo, se ha comprobado que los ácidos húmicos son capaces de interaccionar con NPs de óxido de Fe, disminuyendo la agregación de las mismas (Peijnenburg y col. 2015).

Las sustancias húmicas son ampliamente estudiadas porque son capaces de alterar la movilidad y el destino de contaminantes y coloides (IUPAC 1997). Son los principales componentes de la materia orgánica disuelta en aguas superficiales (Aiken y col 1985). La materia orgánica puede definirse como el material de origen vegetal y animal, y sus productos de degradación (IUPAC 1997). Dentro de los productos de degradación encontramos biopolímeros, polisacáridos y sustancias húmicas (IUPAC 1997). Estas últimas no tienen una estructura química definida, pero se sabe que están asociadas con los compuestos que les dieron origen (Fig. 14) (IUPAC 1997). En sus estructuras presentan un gran contenido de grupos funcionales que les otorgan una

densidad de carga negativa. Los principales grupos funcionales presentes son ácidos carboxílicos, carbonilos, hidroxilos y fenoles (Verrengia Guerrero 2007).

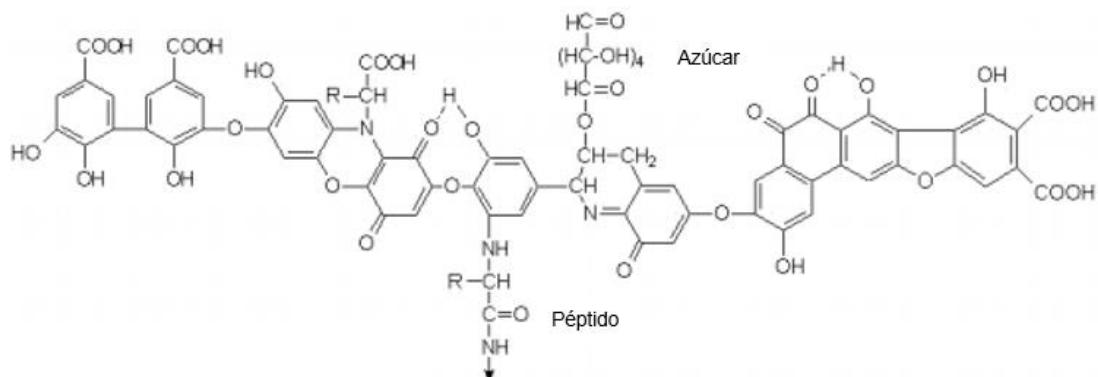


Fig. 14. Estructura química propuesta para las sustancias húmicas (Stevenson 1982).

Las sustancias húmicas pueden dividirse en tres grupos en base al peso molecular y a la solubilidad (IUPAC 1997):

- Ácidos fulvicos: son la fracción de menor peso molecular y son solubles en soluciones ácidas y en soluciones alcalinas.
- Ácidos húmicos: son moléculas con un peso molecular mayor que el de los anteriores y se solubilizan en medios alcalinos, pero no en medios ácidos.
- Huminas: son moléculas de alto peso molecular, insolubles tanto en medio alcalino como en medios ácidos.

Otro proceso importante que pueden experimentar las NPs debido a su gran área superficial, es la adsorción de sustancias químicas de origen orgánico, inorgánico o biológico (Peijnenburg y col. 2015).

Mediante este proceso las NPs pueden funcionar como transportadores de compuestos tóxicos tales como los metales pesados (Cd^{2+} , Pb^{2+} , etc.) (Naasz y col. 2018).

Introducción

Desde el punto de vista ecotoxicológico, el Cd²⁺ y el Pb²⁺ han sido ampliamente estudiados y monitoreados debido a la toxicidad que presentan y a su persistencia en el ambiente ya que se trata de elementos metálicos y por ende no son degradables (Jaishankar y col. 2014, Flora y col. 2012).

El Cd²⁺ se obtiene principalmente como subproducto de la refinación de zinc y en una menor cantidad como subproducto de la refinación de plomo y de cobre (Nordic Council of Ministers 2003a). Los compuestos de cadmio son utilizados en la fabricación de baterías de níquel-cadmio (NiCd), aleaciones, componentes electrónicos, fertilizantes, pigmentos y estabilizadores plásticos. En los últimos años se ha utilizado para la obtención de NPs (puntos cuánticos) que actúan como semiconductores en dispositivos fotovoltaicos (US EPA 2016).

El Pb²⁺ se obtiene a través de la actividad minera y del reciclado de productos. También es obtenido como subproducto de la refinación de zinc, de cobre, y de plata (Nordic Council of Ministers 2003b). Anteriormente el plomo era utilizado en la fabricación de tuberías, pigmentos, aditivos para gasolinas, revestimiento de cables, etc. En muchos de esos productos, su empleo ha disminuido a lo largo de los años. No obstante, se sigue utilizando en la obtención de pigmentos, como estabilizadores para la síntesis de materiales plásticos, y en baterías (Nordic Council of Ministers 2003b, Tong y col. 2000).

Tanto el Cd²⁺ como el Pb²⁺, pueden ser liberados al ambiente por medio de fuentes naturales como antropogénicas. Dentro de las principales fuentes naturales encontramos las erupciones volcánicas, la meteorización de rocas y los incendios forestales (US EPA 2016, Nordic Council of Ministers 2003b). Por otra parte, la actividad minera, de industrias de fundición, la fabricación de productos, los procesos de combustión, el uso agrícola y los desechos domiciliarios conforman las fuentes antropogénicas más importantes (England Public Health 2017, US EPA 2016, Flora y col. 2012, Nordic Council of Ministers 2003a, 2003b, Okocha y Adedeji 2011).

En los sistemas acuáticos, ambos metales pueden adsorberse al material particulado presente (arcillas, lodos, óxidos hidratados, material húmico, etc.) y sedimentar. Por lo tanto, quedan biodisponibles para los organismos del bentos,

como por ejemplo, la especie *Lumbriculus variegatus*. También pueden suspenderse asociados al material particulado o disolverse quedando más biodisponibles en la columna de agua (US EPA 2016). Se ha reportado acumulación de ambos metales en diferentes organismos acuáticos, como por ejemplo peces, mejillones, ostras, entre otros (Okocha y Adedeji 2011, Nordic Council of Ministers 2003b). Además, el Cd²⁺ puede biomagnificarse a través de la cadena trófica (Jaishankar y col. 2014, Okocha y Adedeji 2011). En organismos acuáticos se ha observado que el Cd²⁺ principalmente es acumulado en los riñones y en el hígado, mientras que el Pb²⁺ se acumula principalmente en las estructuras óseas y en las valvas de los moluscos (Okocha y Adedeji 2011, Nordic Council of Ministers 2003b).

El Cd²⁺ y el Pb²⁺ son metales no esenciales. Sus mecanismos de acción toxicológica se basan principalmente en la competencia con metales que cumplen funciones biológicas y en la generación de ROS y su posterior derivación en procesos de estrés oxidativo. El Cd²⁺ se ha demostrado que compite con los cationes Ca²⁺, alterando por ejemplo diversas funciones enzimáticas e inhibiendo las defensas antioxidantes (Jaishankar y col. 2014). Además, el Cd²⁺ provoca principalmente, efectos adversos sobre el hígado y los riñones. También, es un reconocido agente mutagénico y carcinogénico (US EPA 2016, Jaishankar y col. 2014). Por otro lado, el Pb²⁺ compite con cationes bivalentes como el Ca²⁺, el Mg²⁺ y el Fe²⁺ y con cationes monovalentes como el Na⁺. Se han encontrado efectos en procesos de señalización celular, maduración de proteínas, regulación enzimática, entre otros. El Pb²⁺ tiene efectos adversos sobre el sistema nervioso, el sistema hematopoyético, el sistema reproductivo y el sistema cardiovascular (Flora y col. 2012).

En Argentina, el Cd²⁺ y el Pb²⁺ fueron detectados en sedimentos del Río de la Plata (Piol y col. 2005, Verrengia Guerrero y col. 2000). También se detectaron niveles de Cd²⁺ en el orden de los µg Cd g⁻¹ en hígado de *Pimelodus claras* y en la glándula digestiva del gasterópodo *Ampullaria insularum* (Verrengia Guerrero 1995, Verrengia Guerrero y Kesten 1993).

La ley 24.051 de Residuos Peligrosos de la Argentina contiene niveles guía para ambos metales para distintas calidades de aguas (Ley Nacional de Residuos Peligrosos 1992).

La adsorción de estos metales, así como de cualquier otro tipo de sustancias, sobre la superficie de las NPs podría facilitar su ingreso en los organismos y en consecuencia aumentar la toxicidad (Naasz y col. 2018). Esta última hipótesis es conocida como el “efecto caballo de Troya” (Naasz y col. 2018). Sin embargo, no es el único escenario posible. Luego de realizar un análisis de los reportes existentes, Naasz y col. (2018) identificaron siete posibilidades:

- Aumento de la acumulación y la toxicidad
- Aumento de la acumulación y ningún cambio en la toxicidad
- Aumento de la acumulación y disminución de la toxicidad
- Ningún cambio en la acumulación ni en la toxicidad
- Ningún cambio en la acumulación y disminución de la toxicidad
- Disminución de la acumulación y la toxicidad
- Disminución de la acumulación y aumento de la toxicidad

Hipótesis

y

Objetivos

Hipótesis y Objetivos

Para el trabajo de tesis se postulan las siguientes hipótesis, fundadas en la información previamente mencionada:

- Los nanomateriales manufacturados pueden, durante su ciclo de vida, alcanzar los sistemas acuáticos naturales de aguas dulces ya sea por liberación accidental o intencionada. En consecuencia, las nanopartículas son incorporadas y absorbidas por organismos invertebrados que habitan en las aguas y pueden ejercer efectos adversos.
- Para evaluar la toxicidad de nanopartículas mediante bioensayos de laboratorio es requisito realizar una caracterización previa de las nanopartículas y del medio acuoso de exposición para poder determinar el comportamiento de las mismas en el medio de exposición y de esta forma evitar errores en la interpretación de resultados.
- La incorporación de nanopartículas, por parte de los invertebrados acuáticos, genera un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, derivando en efectos adversos citotóxicos y neurotóxicos.
- Una vez incorporadas a los cuerpos de agua dulce, las nanopartículas sufren modificaciones por la presencia de sustancias químicas, de origen natural u antropógenico, en el medio. Por lo tanto, la biodisponibilidad de las nanopartículas y de las sustancias químicas, se modifica.

En base a las hipótesis planteadas, se proponen los siguientes objetivos:

- Caracterizar físico-químicamente las nanopartículas antes y durante la realización de los bioensayos.
- Investigar aspectos relacionados con la toxicocinética de las nanopartículas, especialmente absorción, distribución y eliminación en dos especies de invertebrados acuáticos de diferente hábitat, hábitos alimenticios y complejidad biológica.

Hipótesis y Objetivos

- Investigar la posible ocurrencia de efectos deletéreos sobre: 1) los mecanismos de defensa involucrados en procesos de estrés oxidativo; 2) la degradación enzimática del neurotransmisor acetilcolina.
- Investigar los cambios que se pudieran producir en la absorción de las NPs por presencia de ácidos húmicos o metales pesados.
- Investigar la biodisponibilidad de metales pesados en presencia de las NPs.

Materiales

y

Métodos

4. Reactivos

4.1. Goethita

La suspensión comercial de NPs de goethita fue adquirida a *Sigma Aldrich Argentina* (Código N°:720704-100G, Lote: MKBG2441). En la Tabla 1, se detallan las características de la suspensión, proporcionadas por el proveedor.

| Suspensión comercial de NPs de Goethita | |
|---|---|
| Fórmula Molecular | $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ |
| Composición confirmada | $\alpha\text{-FeOOH}$ |
| Peso molecular | 88,85 g mol ⁻¹ |
| Concentración | 15 - 25 % m/m (20 % m/m) |
| Solvente | Agua |
| Tamaño de partículas promedio | ≤ 30 nm (APS) |
| Tamaño de partículas | ≤ 110 nm (DLS) |
| Densidad | 1,07 - 1,27 g mL ⁻¹ |
| pH | 3,4 - 4,0 |
| Tipo de modificación | Molecular - ácido carboxílico etoxilado |

Tabla 1. Características de la suspensión comercial de NPs de goethita provistas por el fabricante. **APS:** Espectrometría de medida de tamaño aerodinámico de partículas. **DLS:** Dispersión dinámica de la luz.

4.2. Magnetita

La suspensión comercial de NPs de magnetita fue adquirida a *Sigma Aldrich Argentina* (Código N°:725358-5mL, Lote: MKBK2254V). Las características de la suspensión declaradas por el proveedor, se detallan en la Tabla 2.

| Suspensión comercial de NPs de Magnetita | |
|--|--|
| Fórmula Molecular | Fe ₃ O ₄ |
| Peso molecular | 231,53 g mol ⁻¹ |
| Concentración | 5 g mL ⁻¹ |
| Solvente | Agua |
| Tamaño de partículas promedio | 10 nm |
| Tamaño de partículas | 9 - 11 nm (TEM) |
| Densidad | 1,27 g mL ⁻¹ |
| Magnetización | > 45 emu/gat 4500 Oe |
| Tipo de modificación | Contiene < 1,0 % cadenas cortas de PEG |

Tabla 2. Características de la suspensión comercial de NPs de magnetita provistas por el fabricante. **TEM:** Microscopía de transmisión electrónica. **PEG:** Polietilenglicol.

4.3. Ácidos húmicos

Los ácidos húmicos (AH) se adquirieron a *Fluka Chemie AG* (Código N°: 53680). En la Tabla 3 se detalla la composición y el rango de pesos moleculares según la información suministrada por el proveedor.

| Ácidos húmicos | |
|----------------|------------|
| Carbono | 46,63 % |
| Hidrógeno | 4,30 % |
| Nitrógeno | 0,72 % |
| Peso molecular | 600 - 1000 |

Tabla 3. Composición y peso molecular de los AH utilizados.

La solución de trabajo (20 mg L⁻¹) se preparó a partir de una solución intermedia conteniendo 60 mg AH L⁻¹ preparada en agua milli-Q, a partir de los AH comerciales.

La solución intermedia de 60 mg L⁻¹ fue sonicada (lavador ultrasónico Testlab) durante 15 minutos a una potencia de 160 W antes de tomar la alícuota necesaria para la preparación de las soluciones de 20 mg L⁻¹ de AH.

5. Cultivos de invertebrados acuáticos

Para los bioensayos y los cultivos se empleó agua de red declorada como medio de exposición. El agua fue depositada en baldes de 20 L de capacidad, dejándola reposar por al menos 24 h para la eliminación del cloro. Previo a los bioensayos, se filtró por una columna de carbón activado, para eliminar el cloro remanente y cualquier posible materia orgánica presente (US EPA 2002).

Los parámetros físico-químicos se detallan en la Tabla 4. Los valores de dureza y de alcalinidad se obtuvieron por medio de titulaciones complejométricas, empleando ácido etilendiamino tetracético (EDTA) como agente complejante y negro de ericromo T (NET), y naranja de metilo como indicadores colorimétricos de punto final, respectivamente (US EPA 2002).

La determinación de los valores de pH, conductividad y oxígeno disuelto se realizó con un equipo Water Quality Meter 850081 Sper Scientific LTD, empleando los electrodos ALPHA PW-40/PY- 41 ALTRONIX, Conductivity/TDS Probe 850084 Sper Scientific LTD y Dissolved Oxygen Probe 850087 Sper Scientific LTD, respectivamente. Previo a las determinaciones, los electrodos fueron calibrados utilizando, soluciones estándares de pH 4,00 y pH 7,00 para el electrodo de pH, solución estándar de KCl 0,01 M ($1,413 \text{ S cm}^{-1}$) para el electrodo de conductividad y, el electrodo de oxígeno fue calibrado al aire y la calibración se verificó empleando agua libre de oxígeno disuelto obtenida por el agregado de Na_2SO_3 en exceso y CoCl_2 en concentración traza.

| Agua de red declorada | |
|-----------------------|---|
| Dureza | $48 \pm 3 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ |
| Alcalinidad | $29 \pm 2 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ |
| pH | $7,0 \pm 0,2$ |
| Conductividad | $168 \pm 6 \mu\text{S cm}^{-1}$ |
| Oxígeno disuelto | $8,1 \pm 0,4 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ |

Tabla 4. Valores promedio (\pm DE) de los parámetros físico-químicos determinados en el agua de red declorada.

5.1. *Lumbriculus variegatus*

Los organismos fueron cultivados en peceras de 12 litros, a una temperatura de 22 ± 2 °C, con un foto-período 16:8 h luz/oscuridad (Fig. 15). Las peceras se llenaron con tiras de toallas de papel no blanqueadas y prelavadas hasta una profundidad de 3 – 6 cm, y con aproximadamente 8 litros de agua decolorada constantemente aireada (Drewes 2018b). El agua de la pecera era renovada cada 7 días. Los organismos se alimentaban tres veces por semana con una suspensión (0,5 g en 25 mL de agua decolorada) de TetraFin ® (TetraWerke, Melle, Germany) finamente molido (Simkiss y col. 2000, Davies y col. 1999).

Para los bioensayos, se seleccionaron organismos adultos de $3,5 \pm 0,5$ cm de longitud en buen estado general. Ejemplares con menor longitud no se utilizaron ya que podrían encontrarse en un período de desarrollo, durante el cual están regenerando su cuerpo. Organismos mayores, tampoco, ya que podrían fragmentarse durante los bioensayos.

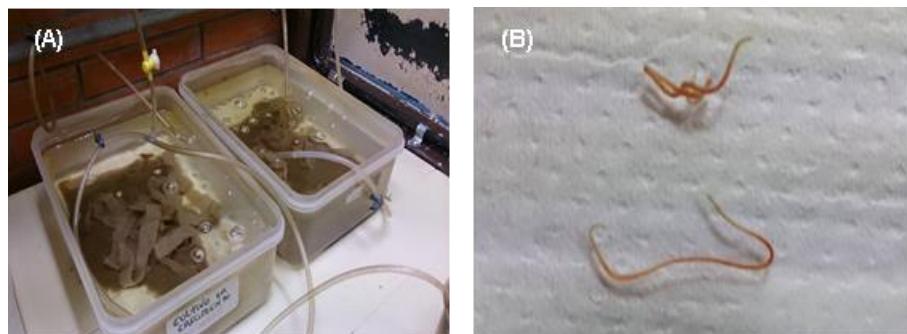


Fig. 15. *Lumbriculus variegatus*. (A) cultivos del laboratorio. (B) organismos.

5.2. *Biomphalaria glabrata*

Los organismos se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio en una pecera de 20 litros de capacidad, a una temperatura de 22 ± 2 °C, bajo un foto-período 16:8 h luz/oscuridad (Fig. 16). El agua de la pecera era renovada cada 15 días. Los animales se alimentaban tres veces por semana, con hojas de

lechuga tipo mantecosa, lavadas con agua de red desclorada (De Freitas Tallarico y col. 2016).

Para los bioensayos se utilizaron caracoles *Biomphalaria glabrata* adultos, de tamaño similar ($1,0 \pm 0,2$ cm de diámetro de caparazón).

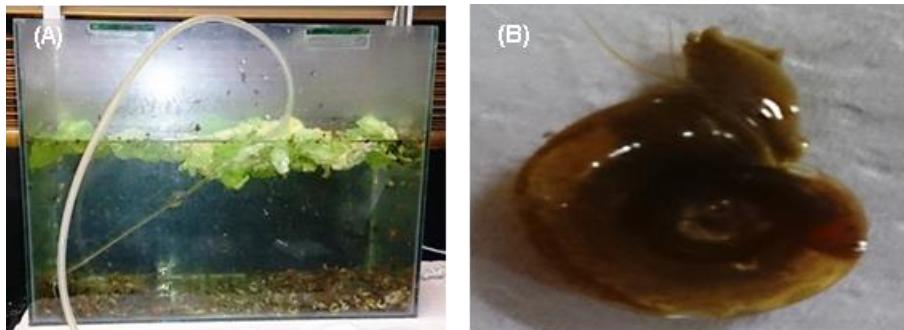


Fig. 16. *Biomphalaria glabrata*. (A) cultivo del laboratorio. (B) organismo.

6. Caracterización físico-química de nanopartículas

Las NPs de goethita y magnetita presentes en las suspensiones comerciales fueron caracterizadas empleando diferentes técnicas. En el caso de la suspensión de trabajo de NPs de goethita (10 mg L^{-1}) la caracterización se efectuó en presencia y ausencia de AH.

En la Fig. 17 se puede observar un esquema de las determinaciones realizadas.

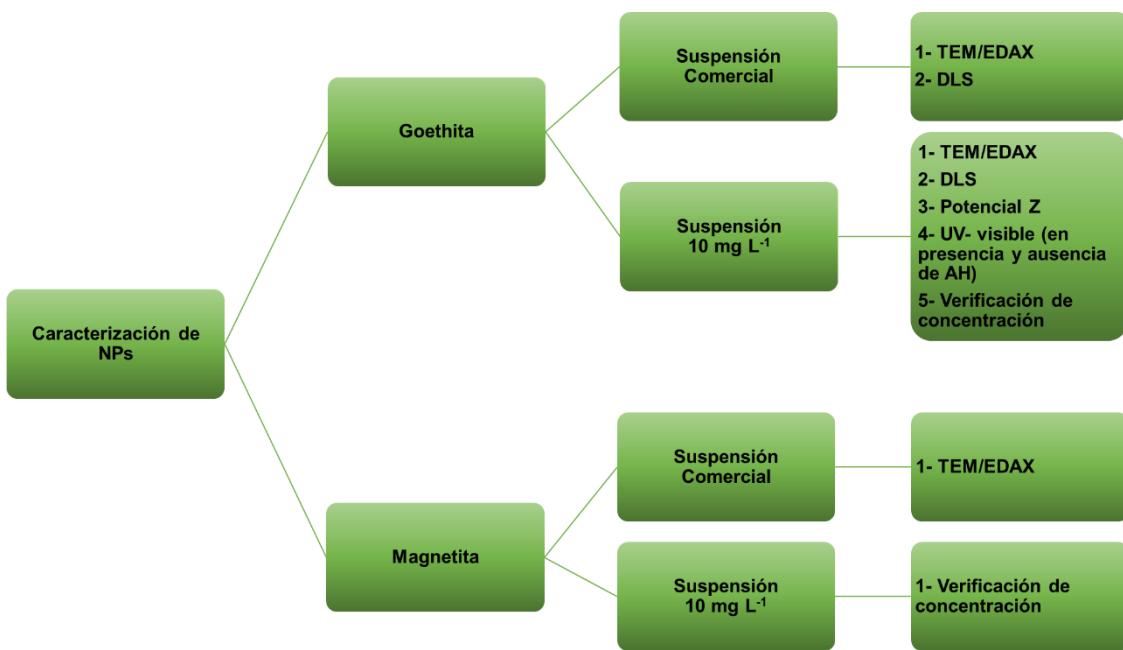


Fig. 17. Esquema de la caracterización de NPs de goethita y magnetita. **TEM/EDAX:** Microscopía de transmisión electrónica acoplada con análisis dispersivo de rayos X. **DLS:** Dispersión dinámica de la luz. **AH:** Ácidos húmicos.

Las suspensiones comerciales de NPs de goethita y magnetita, así como la utilizada en los bioensayos 10 mg L^{-1} de NPs de goethita, fueron analizadas por TEM. El análisis se realizó en la Comisión de Energía Atómica (CNEA), gracias a la colaboración de las Dras. Patricia Bozzano y Paula Alonso (Gerencia de Materiales).

Para esto, se colocó una gota de $5 \mu\text{L}$ de la suspensión en una grilla de cobre con film formvar/carbono (soporte de muestras para visualizar en el TEM) y se llevó a sequedad con una lámpara infrarroja. Las muestras fueron observadas en un equipo marca PHILIPS modelo CM200 operando a 160 o 200 KV.

Además, el microscopio permitió obtener el patrón de difracción de las NPs, que permitió conocer la estructura (cristalina u amorfa) de las mismas.

Acoplado al TEM se contó con un equipo de análisis de energía dispersiva de rayos X (EDAX, por sus siglas en inglés), con el que se pudo identificar los elementos químicos que conformaban las NPs de las suspensiones.

El tamaño de partícula se determinó empleando la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés), en una suspensión de goethita de 2.500 mg L^{-1} preparada en agua milli-Q a partir de la suspensión intermedia de 5.000 mg L^{-1} y de una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L^{-1} en agua declorada.

Se determinó el tamaño de partícula de la suspensión de 2.500 mg L^{-1} , filtrada por membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de $0,22 \mu\text{m}$ y de la suspensión de 10 mg L^{-1} sin filtrar y filtrada por membrana de PTFE de $0,22 \mu\text{m}$. También se analizó el agua declorada filtrada por membrana de PTFE de $0,22 \mu\text{m}$.

Para evaluar la estabilidad de la suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita, se determinó el valor de potencial Z, de la suspensión y del agua declorada.

El tamaño de partícula y el potencial Z se determinaron empleando el equipo Zetasizer modelo NanoZS (Malvern Instruments). Las determinaciones se realizaron en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), gracias a la colaboración de la Dra. María Victoria Defain Tesoriero (Centro de Química-Laboratorio de Sistemas de Liberación Controlada).

Se determinaron los espectros UV-Visible de suspensiones de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita en presencia y ausencia de AH en una concentración de 20 mg L^{-1} .

Se tomaron los espectros del seno de las suspensiones recién preparadas ($t = 0 \text{ h}$) y una vez transcurridas 48 h de su preparación.

7. Bioensayos

En la Fig. 18 se presenta un esquema de las determinaciones realizadas para evaluar la incorporación de NPs:

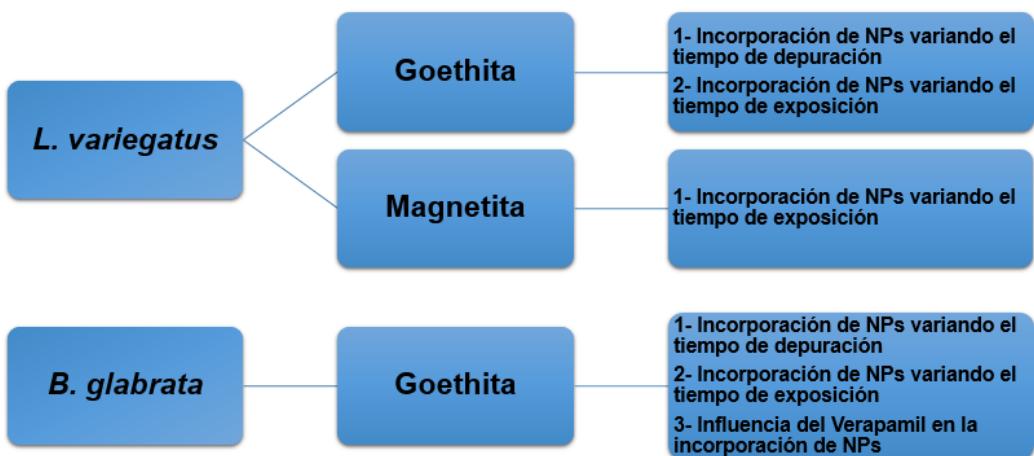


Fig. 18. Esquema de los estudios realizados para evaluar la incorporación de NPs.

Básicamente, el esquema general de trabajo para efectuar los bioensayos fue el siguiente: Los organismos fueron expuestos de forma aguda (48 h) a suspensiones de NPs de 10 mg L^{-1} , en condiciones estáticas a una temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y un foto-período 16 h:8 h (luz:oscuridad). Durante el período de exposición los organismos no fueron alimentados.

Las suspensiones de NPs de goethita y de NPs de magnetita de 10 mg L^{-1} , fueron preparadas en agua declorada a partir de suspensiones intermedias conteniendo 5.000 mg L^{-1} y 2.500 mg L^{-1} , respectivamente. Las suspensiones intermedias fueron preparadas en agua milli-Q, a partir de las suspensiones comerciales de NPs, las cuales fueron previamente agitadas durante 5 minutos antes de tomar la cantidad necesaria. Previo a la preparación de las suspensiones de 10 mg L^{-1} , las suspensiones intermedias fueron sonicadas a 160 W de potencia durante 30 minutos.

Las suspensiones de 10 mg L^{-1} fueron preparadas agregando dos tercios de agua declorada, luego la alícuota de la suspensión intermedia y, por último, un tercio del agua declorada, completando así el volumen final que correspondiese según fuera el organismo utilizado.

Previo a la exposición los organismos fueron separados de las peceras y se mantuvieron por 24 h en agua declorada, para depurar el contenido presente en el tracto digestivo.

Los oligoquetos se expusieron en viales de vidrio de 25 mL de capacidad, conteniendo 20 mL de la suspensión de NPs. En cada vial se colocaron aproximadamente unos 20 organismos (Fig. 19).



Fig. 19. *L. variegatus* expuestos en viales de 25 mL de capacidad, conteniendo 20 mL de agua declorada (izquierda) y contenido 20 mL de suspensión de NPs (derecha).

Para los gasterópodos, las exposiciones se realizaron en vasos de precipitado de vidrio de 500 mL de capacidad, conteniendo 300 mL de la suspensión de NPs. Se colocó un organismo por vaso de precipitado.

Paralelamente se realizaron bioensayos controles, en los cuales los organismos se expusieron solamente a agua declorada.

Se ensayaron seis réplicas ($n= 6$) por cada exposición realizada.

Luego de cada exposición, los organismos se depuraron para evitar sobreestimar la fracción verdaderamente absorbida, de la presente transitoriamente en el tracto gastrointestinal o adsorbida sobre el epitelio animal. Para esto, los organismos fueron transferidos a recipientes conteniendo agua declorada durante el período más conveniente según el estudio de eliminación en condiciones estáticas a una temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los oligoquetos y los gasterópodos se depuraron en viales de vidrio de 25 mL o en vasos de precipitado de vidrio de 500 mL, conteniendo 20 mL y 300 mL de agua declorada, respectivamente.

Para los estudios de eliminación, los organismos fueron transferidos a viales conteniendo únicamente agua declorada. En el caso de los oligoquetos, los tiempos de depuración estudiados fueron $t = 0, 4, 16$, y 24 h . Para los gasterópodos, los tiempos de depuración fueron $t = 4$ y 24 h . Al término de dichos períodos, los análisis de Fe se realizaron sobre un *pool* de aproximadamente 15-20 oligoquetos, debido a su pequeño tamaño. En el caso de los gasterópodos los análisis se efectuaron sobre distintos tejidos: céfalo-pedal, hemolinfa y el conjunto de las restantes regiones anatómicas (pulmonar + digestiva + gónadas).

La incorporación de NPs se evaluó variando el tiempo de exposición. Los oligoquetos fueron expuestos por 24 h , 48 h y 96 h a NPs de goethita o de magnetita (10 mg L^{-1}). Los gasterópodos fueron expuestos a NPs de goethita por 48 h y 96 h . En ambos casos, el tiempo de depuración fue de 24 h .

En *B. glabrata*, se investigó también la influencia del verapamil, un reconocido inhibidor selectivo de los canales de Ca^{2+} , en la incorporación de NPs de goethita. Los organismos fueron expuestos a suspensiones de 10 mg NPs L^{-1} , en presencia y ausencia de $50\text{ }\mu\text{M}$ verapamil, así como a soluciones conteniendo solamente verapamil. Además, se prepararon suspensiones de NPs en ausencia y presencia de verapamil, y soluciones conteniendo únicamente verapamil, con el fin de realizar los espectros de absorción entre 200 nm y 500 nm , a $t = 0\text{ h}$ y 48 h . Los espectros fueron tomados del seno de las suspensiones/soluciones. Estas determinaciones se efectuaron para comprobar posibles interacciones entre las NPs y el verapamil.

7.1. Análisis de Hierro

Previo a estudiar la incorporación de NPs en los organismos se realizaron determinaciones que tuvieron como objetivos: 1) estimar el nivel experimental de NPs al cual los organismos eran expuestos en los bioensayos; 2) verificar la eficiencia de la digestión de NPs de goethita y magnetita con ácido nítrico concentrado, en presencia y ausencia de tejido biológico, con el fin de utilizar esta técnica para estimar la incorporación de NPs en los organismos.

En primer lugar, se tomaron alícuotas de 20 μL y 40 μL de las suspensiones intermedias (de 5.000 mg L⁻¹ de NPs de goethita y 2.500 mg L⁻¹ de NPs de magnetita, respectivamente) previamente sonicadas durante 30 minutos a 160 W y se llevaron a un volumen final de 2 mL con ácido nítrico (c). Seguidamente las suspensiones fueron calentadas a T = 100 °C durante 8 h. Posteriormente, los residuos se llevaron a un volumen final de 10 mL con ácido nítrico, 1 %V/V. El mismo tratamiento se realizó en presencia de tejido biológico de ambas especies de organismos, *L. variegatus* y *B. glabrata*.

La concentración de Fe se determinó mediante la directa atomización en una llama de aire-acetileno, empleando un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian, modelo AA-575), y una lámpara de cátodo hueco (Varian) de Fe. Las lecturas fueron tomadas a una longitud de onda de 248,3 nm. El ruido de fondo se corrigió con una lámpara de deuterio.

La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración (2,5 mg Fe L⁻¹ – 10,0 mg Fe L⁻¹). La curva se preparó en HNO₃, 1 %V/V, a partir de un estándar de Fe de 1.000 mg L⁻¹ (Tritisol Merck, FeCl₃). El límite de detección fue igual a 0,1 mg Fe L⁻¹.

La eficiencia de la digestión se comprobó comparando las concentraciones de Fe medidas en las soluciones con respecto a las concentraciones nominales de Fe.

Para estimar el ingreso de las NPs, cada *pool* de oligoquetos fue anestesiado a T = 4 °C. Seguidamente, los organismos fueron transferidos a un vidrio reloj, eliminando con papel de filtro el exceso de agua. Luego se pesaron y se transfirieron a tubos de vidrio borosilicato de 10 mL junto con 0,5 mL de HNO₃ (c). Los organismos de la especie *B. glabrata* fueron anestesiados en forma similar y se procedió a retirarles las valvas. Según el caso, se analizó el tejido blando total de cada gasterópodo, o bien se procedió a la disección de la región céfalo-pedal del resto de las regiones anatómicas (zona pulmonar + digestiva + gónadas). La hemolinfa fue obtenida por punción del organismo entero mediante micropipeta. Los tejidos fueron transferidos a tubos de vidrio de borosilicato de 25 mL a los cuales se les agregó 2 mL de HNO₃ (c).

La destrucción de la materia orgánica se realizó a una $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 h. En simultáneo, se realizaron blancos de reactivos por triplicado. Por último, las soluciones resultantes de la DMO se llevaron a volumen final de 5 mL con HNO_3 , 1 %V/V.

Todo el material de vidrio involucrado en los análisis de Fe fue previamente prelavado con soluciones de ácidos minerales diluidos (5 %V/V HCl + 5 %V/V HNO_3), por al menos 24 h, y luego enjuagado con abundante agua bidestilada.

7.2. Parámetros biomarcadores

Al igual que en la determinación de Fe (Materiales y Métodos, ítem 4.1), cada *pool* de 15-20 oligoquetos fue anestesiado a $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seguidamente, los organismos fueron transferidos a un vidrio reloj, eliminando con papel de filtro el exceso de agua y se pesaron. Los organismos de la especie *B. glabrata* fueron anestesiados en forma similar y se procedió a retirarles las valvas.

Los homogenatos se realizaron utilizando un homogenizador (Precytec). Para los organismos de la especie *L. variegatus*, los homogenatos se realizaron utilizando el total del tejido, mientras que para la especie *B. glabrata* las determinaciones se realizaron sobre los tejidos blandos excluyendo la región céfalo-pedal.

El contenido de proteínas se determinó acorde al método descripto por Lowry y col. (1951), empleando albúmina sérica bovina como estándar de calibración.

7.2.1. Parámetros relacionados con procesos de estrés oxidativo

En la Fig. 20 se muestra un esquema de las determinaciones realizadas:

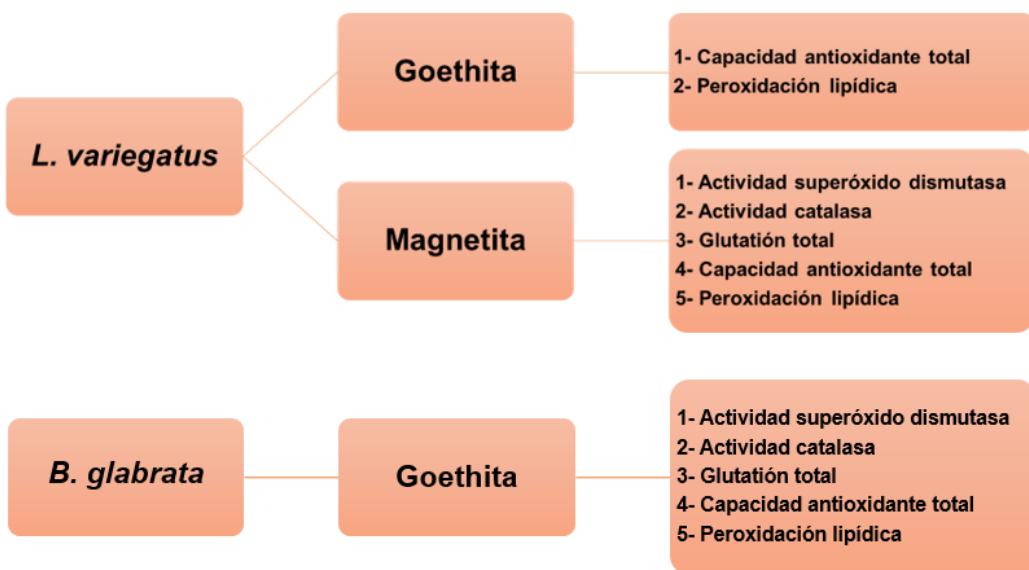


Fig. 20. Esquema de los parámetros biomarcadores relacionados con procesos de estrés oxidativo analizados.

7.2.1.1. Superóxido dismutasa

La determinación se fundamenta en que la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) es capaz de inhibir la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo, el cual es medido por espectrofotometría UV-Visible a 485 nm (Fig. 21).

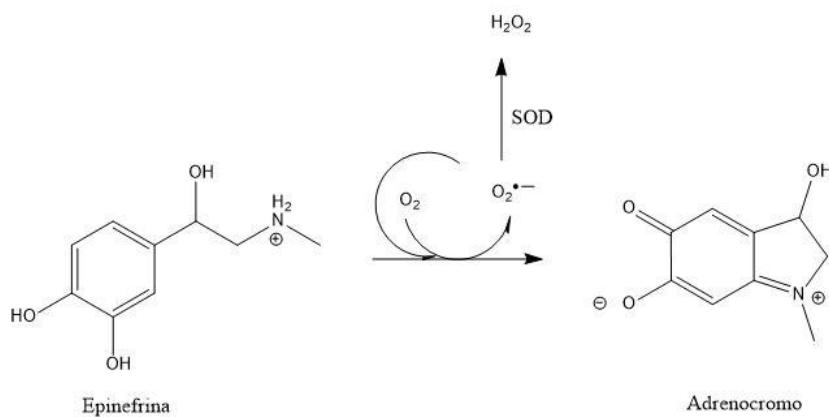


Fig. 21. Determinación de la actividad de la enzima SOD medida a través de la inhibición de la autooxidación de la epinefrina.

Se utilizó la metodología descripta por Cochón y col. (2007) . Los tejidos de ambas especies fueron homogeneizados en una relación 1:5 (tejido:volumen) en buffer fosfato 0,05 M, pH 7,0 conteniendo 0,01 M de EDTA. Seguidamente se centrifugaron a 3.000 x g por 15 minutos a 4 °C y se determinó la actividad de SOD en los sobrenadantes.

La reacción se efectuó en un volumen de 1 mL, conteniendo 10 mM de epinefrina, buffer 50 mM de carbonato de sodio pH 10,2 y 10 mM de EDTA. La formación de adrenocromo se determinó a 485 nm, en un intervalo de tiempo de 810 segundos.

El resultado se expresó en unidades de SOD por mg de proteína (U mg de proteína⁻¹). La unidad de SOD (U) se define como la cantidad de muestra que causa el 50 % de inhibición de la autooxidación de la epinefrina.

7.2.1.2. Catalasa

La determinación consiste en monitorear la cinética de reacción de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en presencia de la enzima catalasa, por medio de un espectrofotómetro UV-Visible a 240 nm (Fig. 22).

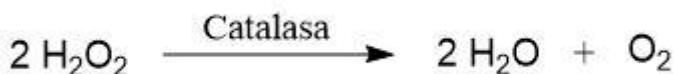


Fig. 22. Determinación de la actividad de la enzima catalasa medida por descomposición del peróxido de hidrógeno.

Se procedió de acuerdo a la metodología descripta por Cochón y col. (2007). Para ambas especies se realizaron homogenatos en relación 1:5 (tejido:volumen) en buffer fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,0 conteniendo 0,01 M de EDTA. Luego se centrifugaron a 3.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se diluyeron al medio (1:2) con buffer fosfato de sodio 0,05 M, pH

7,0, conteniendo 0,1 %V/V Tritón X100. Por último, se sonicaron por 5 minutos a una potencia de 160 W y se emplearon como fuente enzimática.

La descomposición del H₂O₂ se midió a 240 nm durante 2 minutos, tomando lecturas de absorbancia cada 10 segundos.

Se considera que la unidad de actividad de catalasa es la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 µmol de peróxido de hidrógeno en 1 minuto a pH 7,0 a 25 °C. El resultado de la actividad de catalasa se expresa en µmol (minuto mg proteína)⁻¹.

7.2.1.3. Glutatión total

Para la determinación del glutatión total (t-GSH), se empleó el método de reciclado descripto por Griffith (1980). La determinación se basa en la oxidación del glutatión por el 5,5'-ditiobiis(2-nitro-ácido benzoico) (DTNB) y reducción con NADPH en presencia de glutatión reductasa. La formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) es monitoreada espectrofotométricamente a 412 nm. (Fig. 23).

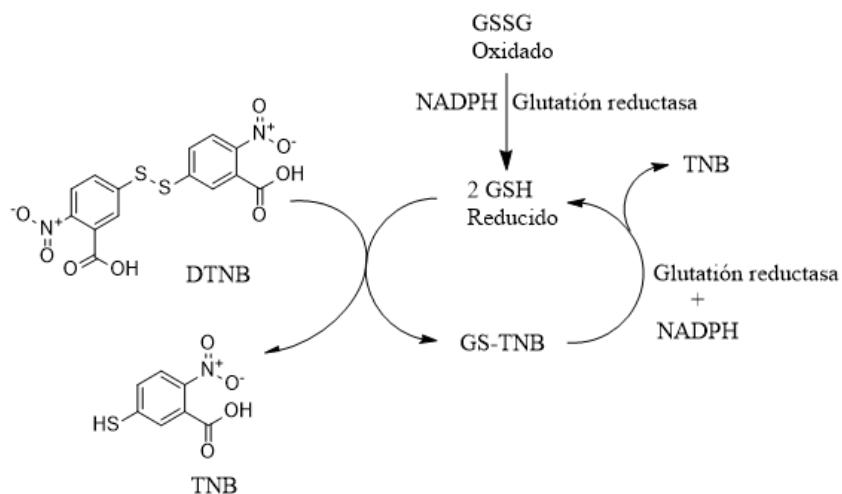


Fig. 23. Determinación de los niveles de t-GSH medidos por la formación de TNB.

Los homogenatos se prepararon en relación 1:5 (tejido:volumen) en buffer fosfato 125 mM pH 7,5 con 6,3 mM EDTA. Se tomaron 0,9 mL de cada homogenato y se les agregó 0,1 mL de ácido tricloroacético al 30 %V/V (TCA) y luego se incubaron por 15 minutos en hielo. Luego se centrifugaron a 11.000 x g por 5 minutos y los sobrenadantes se emplearon para la determinación t-GSH.

Los niveles de t-GSH se determinaron empleando una curva de calibración (0,5 – 10,0 nmoles GSH). Los niveles de la curva se prepararon a partir de un estándar de GSH (Merck). Los resultados se expresaron en nmoles mg proteína⁻¹.

7.2.1.4. Capacidad antioxidante total

La determinación de TOSC se realizó según Gorbi y Regoli (Abele y col. 2012).

Esta determinación se realiza mediante cromatografía gaseosa (GC, por sus siglas en inglés) con detector de ionización a la llama (FID, por sus siglas en inglés), empleando la técnica de espacio-cabeza (*head-space*).

La técnica se optimizó para el estudio de la capacidad antioxidante total frente a radicales peroxilos e hidroxilos.

El primer paso fue identificar el tiempo de retención del etileno, indicador de la presencia de los radicales antes mencionados ya que el ácido α-ceto-Y-(metiltio)butírico (KMBA), en presencia de especies reactivas de oxígeno, reacciona dando lugar a la formación de etileno, el cual es determinado por GC-FID. Para esto se inyectó 1 mL del espacio de cabeza de un vial de 10 ml que contenía patrón puro de etileno, recibido de la Lic. Gabriela Munizza (INTI-Centro de Plásticos- Unidad Técnica de Tecnología para Productos), en las siguientes condiciones cromatográficas:

Equipo: cromatógrafo gaseoso Agilent 6890 Serie N

Columna: Supelco Q-Plot (longitud: 30 m y d.i.: 530 mm)

Temperatura del Inyector: 180 °C

Fase móvil: N₂

Flujo de la fase móvil: 4,7 mL min⁻¹

Temperatura del horno: 35 °C

Tiempo de corrida: 6 minutos

Temperatura del detector (FID): 250 °C

Luego se prosiguió a estudiar la generación de etileno por descomposición del KMBA en presencia de radicales peroxilos e hidroxilos. Se colocaron en viales de 10 mL de capacidad, 1 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,5, conteniendo 0,2 mM de KMBA y 20 mM de 2-2'-azo-bis-(2-metilpropionamidina) (ABAP) (para generar radicales ROO[·]) o Fe³⁺-EDTA (1,8 µM-3,6 µM) más ácido ascórbico 180 µM (para generar radicales OH[·]). Luego se incubaron a 35 °C durante 15 minutos y posteriormente se inyectó 0,5 mL del espacio de cabeza de cada vial en el GC-FID en las condiciones cromatográficas descriptas anteriormente. El pico de etileno fue identificado por su tiempo de retención comparando los cromatogramas obtenidos con el cromatograma del patrón de etileno puro.

El siguiente paso consistió en observar la variación de etileno producido durante 90 minutos y modelar matemáticamente esa variación. Para esto, se realizaron curvas control, para cada especie reactiva de oxígeno, cada una con siete viales de 10 mL conteniendo 1 mL de reactivos como se indicó en el paso anterior. Los siete viales de cada curva, fueron incubados a 35 °C y cada 15 minutos durante un lapso de 90 minutos, inyectando 0,5 mL del espacio de cabeza de un vial en el GC-FID (cada vial fue inyectado una sola vez). Se obtuvieron las áreas de los picos cuyo tiempo de retención coincide con el del etileno puro y se graficó área vs tiempo de incubación. Se encontraron las relaciones matemáticas para la generación de etileno en función del tiempo.

Luego se procedió a determinar la cantidad de tejido de cada especie, necesaria para la determinación de la capacidad antioxidante. Se compararon viales controles (contienen todos los reactivos sin homogenato) con viales contenido

todos los reactivos con distintas cantidades de tejidos. Los viales se incubaron a 35 °C por 45 minutos (tiempo medio de la curva) antes de inyectar 0,5 mL del espacio de cabeza en el GC en las condiciones anteriormente descriptas. La cantidad de tejido seleccionada fue la que generó diferencias de etileno entre el 40 % y 80 % con respecto a los controles. La cantidad de tejido seleccionada se estandarizó en microgramos de proteína.

Optimizada la cantidad de tejido para cada especie, se procedió a la determinación de la capacidad antioxidante total. Se analizaron curvas controles (conteniendo los reactivos en ausencia de homogenato) y curvas de organismos expuestos a NPs (conteniendo todos los reactivos más homogenato) y curvas de organismos no expuestos (conteniendo todos los reactivos más homogenato).

Cada curva fue obtenida a partir de siete viales, los cuales se incubaron a 35 °C, inyectando en el GC-FID una alícuota de 0,5 mL del espacio de cabeza de cada vial. Las alícuotas se sacaron cada 15 minutos durante un período de 90 minutos.

Se obtuvieron las áreas del pico con tiempo de retención igual al del etileno puro y se graficaron las curvas de área vs tiempo de incubación.

Posteriormente para cada curva se halló el área bajo la misma y se cuantificó el porcentaje de TOSC comparando el área de las muestras con respecto al área de los controles (100 % de generación de etileno).

7.2.1.5. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se estimó por la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los compuestos generados exhiben un color rosado, el cual es medido por espectrofotometría UV-Visible a 530 nm (Fig. 24) (Cochón y col. 2007).

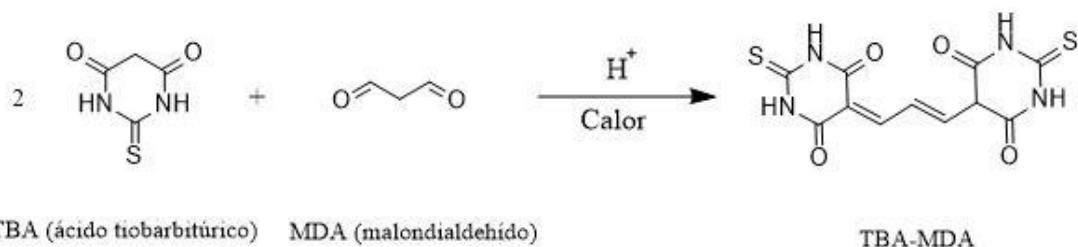


Fig. 24. Determinación de la peroxidación lipídica a través de la medición de especies reactivas al TBA.

Se realizaron homogenatos en agua destilada en relación 1:20 (tejido:volumen) para las dos especies. Luego se centrifugaron a 3.000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente y los sobrenadantes resultantes fueron utilizados para la determinación. Seguidamente se agregaron en tubos de vidrio de hemólisis, 1,0 mL de sobrenadante y 0,5 mL de TCA 20 %V/V y se calentaron en baño de agua a 100 °C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 3.000 x g por 15 minutos y a los sobrenadantes se les agregó 1,0 mL de TBA 0,67 %V/V. Luego, los tubos se volvieron a calentar a 100 °C en baño de agua durante 10 minutos y seguidamente se determinaron las absorbancias a 530 nm.

7.2.2. Parámetros biomarcadores relacionados con efectos neurotóxicos

En la Fig. 25 se muestra un esquema de las determinaciones realizadas:

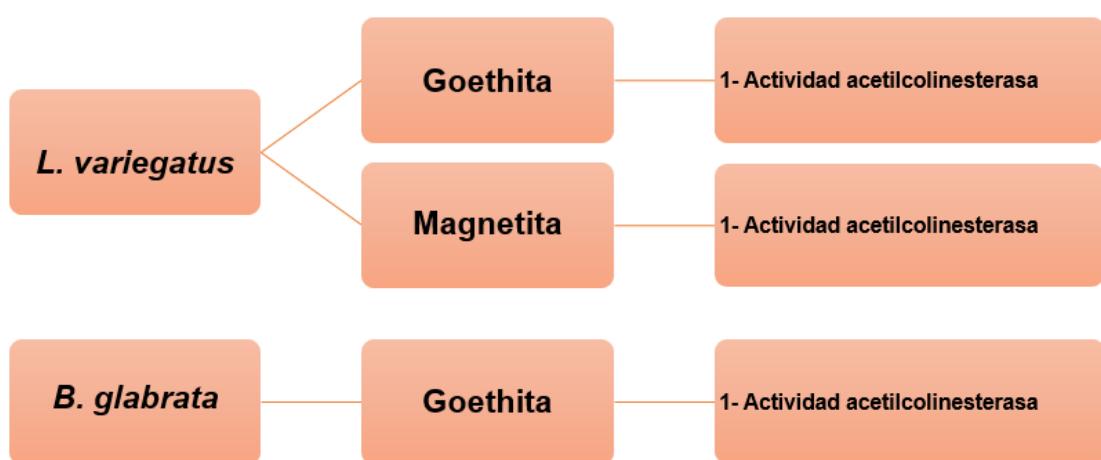


Fig. 25. Esquema del parámetro biomarcador relacionado con efectos neurotóxicos.

Se determinó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La determinación consiste en monitorear la actividad de la enzima AChE siguiendo la cinética de reacción, empleando ioduro de acetiltiocolina (YTAC) como sustrato y 5,5'-ditiobis(2-nitro-ácido benzoico) (DTNB) como agente cromógeno. La técnica se basa en la degradación del sustrato en tiocolina que forma un complejo con el DTNB, dando lugar a la formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) de color amarillo el cual es medido a 412 nm durante 2 minutos (Fig. 26). La formación de color está relacionada con la actividad de la AChE.

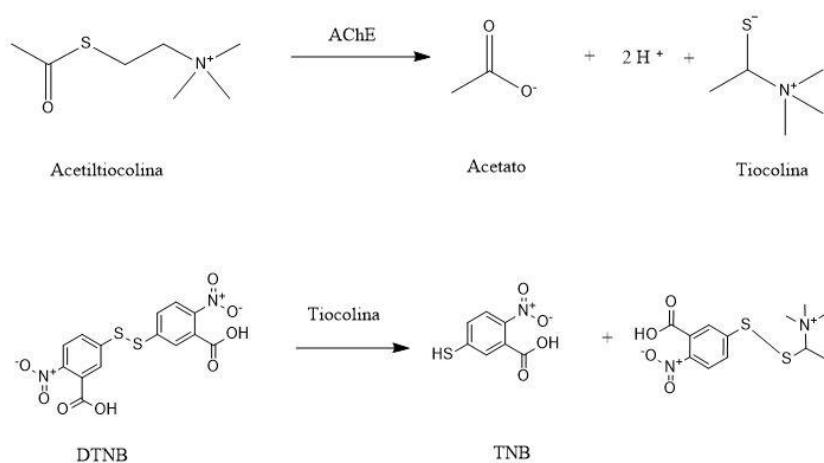


Fig. 26. Determinación de la actividad de la enzima AChE medida a través de la degradación de acetiltiocolina a tiocolina y posterior reacción de tiocolina con DTNB.

Se realizaron homogenatos con una relación 1:10 (tejido:volumen) para ambas especies en buffer Tris (HCl) 20 mM + 0,5 mM EDTA. Luego, los homogenatos fueron centrifugados a 11.000 x g por 20 minutos a 4 °C.

El medio de reacción contenía buffer fosfato 100 mM pH= 8,00 y 0,75 mM de YTAC (Sigma); 0,2 mM de DTNB (Sigma). Las determinaciones se efectuaron a una $\lambda = 412$ nm durante 90 segundos, obteniendo lecturas de absorbancia a intervalos de 10 segundos (Ellman y col. 1961).

La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 μmol de sustrato en un minuto. Los resultados se expresan en μmoles de sustrato hidrolizado ($\text{mg de proteína})^{-1}$.

7.3. Interacciones con otras sustancias químicas

En la Fig. 27 se muestra un esquema de los experimentos realizados.

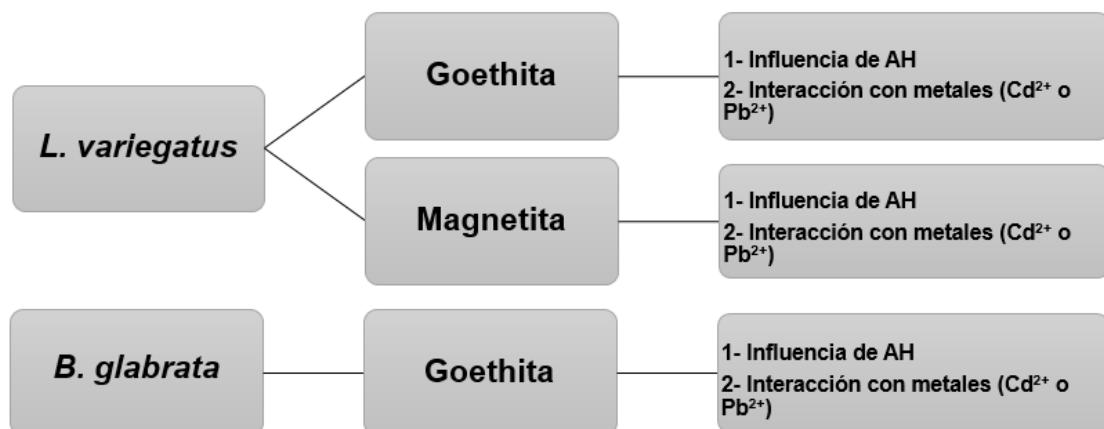


Fig. 27. Esquema de las interacciones con otras sustancias estudiadas.

7.3.1. Influencia de ácidos húmicos

La influencia de una dada solución de ácidos húmicos (20 mg L^{-1}) en la incorporación de las NPs fue evaluada en ambas especies de invertebrados. Para esto, se realizaron bioensayos exponiendo a los organismos a los siguientes sistemas: Control (agua declorada); solución de AH (20 mg L^{-1}); suspensión de NPs (10 mg L^{-1}), y AH + NPs ($20 \text{ mg AH L}^{-1} + 10 \text{ mg NPs L}^{-1}$).

7.3.2. Interacción con metales

La influencia de una solución de Cd^{2+} ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y de una solución de Pb^{2+} ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) en la incorporación de las NPs fue evaluada en ambas especies de invertebrados. Para esto, se realizaron bioensayos exponiendo a los organismos a los siguientes sistemas: Control (agua declorada); solución de Cd^{2+} ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) o solución de Pb^{2+} ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$); suspensión de NPs (10 mg L^{-1}), y $\text{Cd}^{2+} + \text{NPs}$ ($0,1 \text{ mg Cd}^{2+} \text{ L}^{-1} + 10 \text{ mg NPs L}^{-1}$) o $\text{Pb}^{2+} + \text{NPs}$ ($0,5 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ L}^{-1} + 10 \text{ mg NPs L}^{-1}$).

Las concentraciones de exposición seleccionadas de Cd^{2+} y Pb^{2+} , corresponden a los límites permitidos en el vuelco de efluentes industriales, según la ley Argentina de Residuos Peligrosos N° 24.051. Las concentraciones se prepararon a partir de soluciones de 1.000 mg L^{-1} . Las soluciones de 1.000 mg L^{-1} se prepararon en agua bidestilada a partir de las sales $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2} \text{ H}_2\text{O}$ (Merck) y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Mallinckrodt).

La absorción de Cd^{2+} y Pb^{2+} también fue determinada en los sistemas mencionados anteriormente.

Además, en *B. glabrata* la absorción de Cd^{2+} fue estudiada variando la concentración de exposición ($0,02 - 0,30 \text{ mg L}^{-1}$), en ausencia de NPs. Las concentraciones de exposición también se prepararon a partir de la solución de 1.000 mg L^{-1} preparada como se mencionó anteriormente.

Las determinaciones de Cd^{2+} y Pb^{2+} fueron realizadas por AAS a $\lambda = 228,8 \text{ nm}$ y $\lambda = 217,0 \text{ nm}$, respectivamente. Para la cuantificación se emplearon curvas de

calibración de cinco niveles en el rango de concentraciones de 0,05-1,20 mg L⁻¹ para el Cd²⁺ y de 0,15-3,00 mg L⁻¹ para el Pb²⁺.

8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente empleando el ensayo de ANOVA unifactorial. En caso de no cumplir con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas se empleó el ensayo no paramétrico de Kruskal – Wallis ANOVA.

Se empleó el ensayo de SHAPIRO-WILK para el estudio de normalidad de los datos obtenidos y el ensayo de LEVENE para el estudio de la homogeneidad de las varianzas.

Además, se utilizó el ensayo de TUKEY para la evaluación de la media.

El nivel de significancia empleado (α) fue igual a 0,05.

Los resultados de la tesis fueron expresados como:

$$\bar{X} \pm DE$$

siendo:

\bar{X} : Valor promedio del conjunto de mediciones realizadas para un grupo.

DE: Desviación estándar del conjunto de mediciones para un grupo.

Resultados

9. Caracterización de nanopartículas

9.1. Goethita

A través de las imágenes obtenidas por TEM se observó que las NPs contenidas en la suspensión comercial de concentración 20 %m/m, en medio acuoso y pH 3,4–4,0; poseían morfología consistente con goethita (red cristalina ortorrómica alargada, con forma de agujas) y un tamaño de partícula de 108 ± 5 nm, medido en su eje más largo (Fig. 28).

Los mismos resultados se verificaron para la suspensión de trabajo de 10 mg L^{-1} en agua declorada y pH 7,00 (Fig. 29).

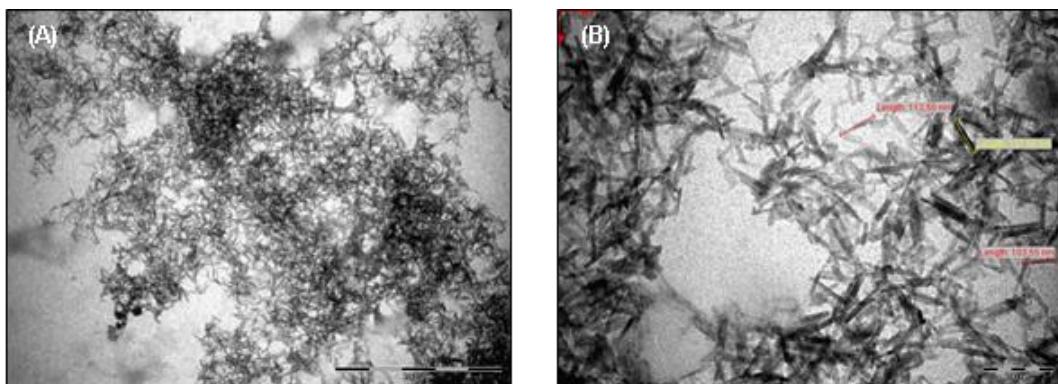


Fig. 28. Imágenes obtenidas por TEM de la suspensión comercial de goethita. **(A)** Escala: 2.000 nm. **(B)** Escala: 200 nm.

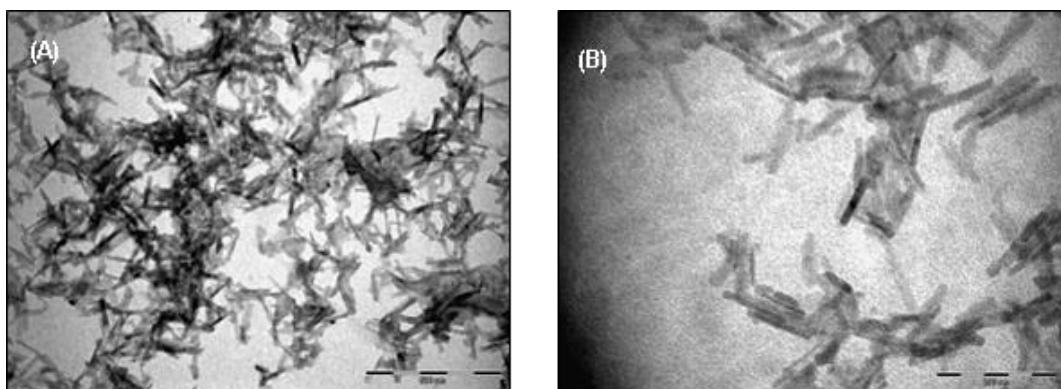


Fig. 29. Imágenes obtenidas por TEM de la suspensión de trabajo de NPs de goethita de concentración 10 mg L^{-1} . **(A)** Escala: 500 nm. **(B)** Escala: 200 nm

Resultados

Por otro lado, el patrón de difracción permitió observar la estructura cristalina de la goethita, tanto en la suspensión comercial (Fig. 30) como en la suspensión de trabajo de 10 mg L⁻¹ (Fig. 31).

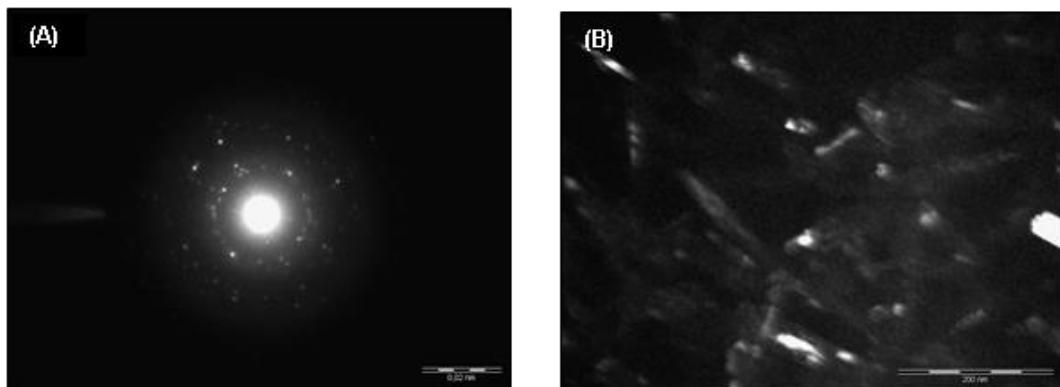


Fig. 30. (A) Patrón de difracción de la suspensión comercial de goethita. **(B)** NPs de la suspensión comercial de goethita, de las cuales se obtuvo el patrón de difracción.

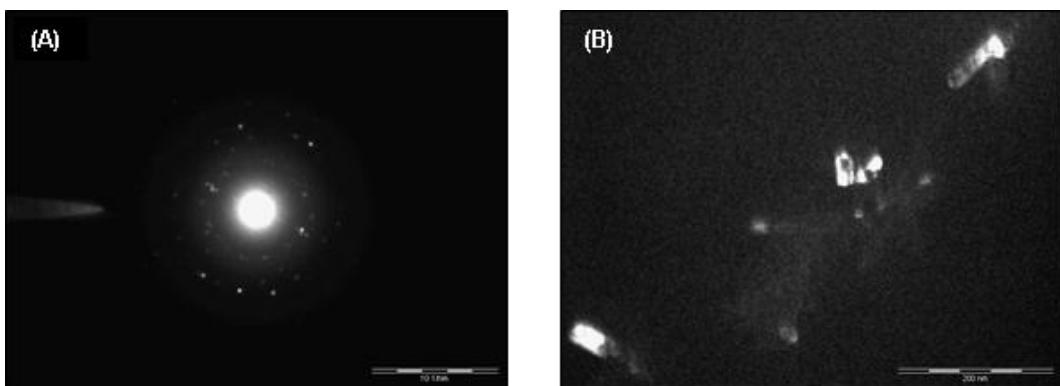


Fig. 31. (A) Patrón de difracción de la suspensión de trabajo de 10 mg L⁻¹. **(B)** NPs de la suspensión de trabajo de 10 mg L⁻¹, de las cuales se obtuvo el patrón de difracción.

Por medio del EDAX se demostró que las NPs de la suspensión comercial (Fig. 32A) como las de la suspensión de 10 mg L⁻¹ (Fig. 32B), estaban compuestas por Fe y O. El cobre (Cu) y el carbono (C), impurezas presentes en los espectros de energía, forman parte de las grillas en las cuales fueron depositadas las muestras para su análisis. El silicio (Si) presente en el espectro de la suspensión comercial es considerado una impureza proveniente del recipiente de vidrio que contenía la suspensión de NPs.

Resultados

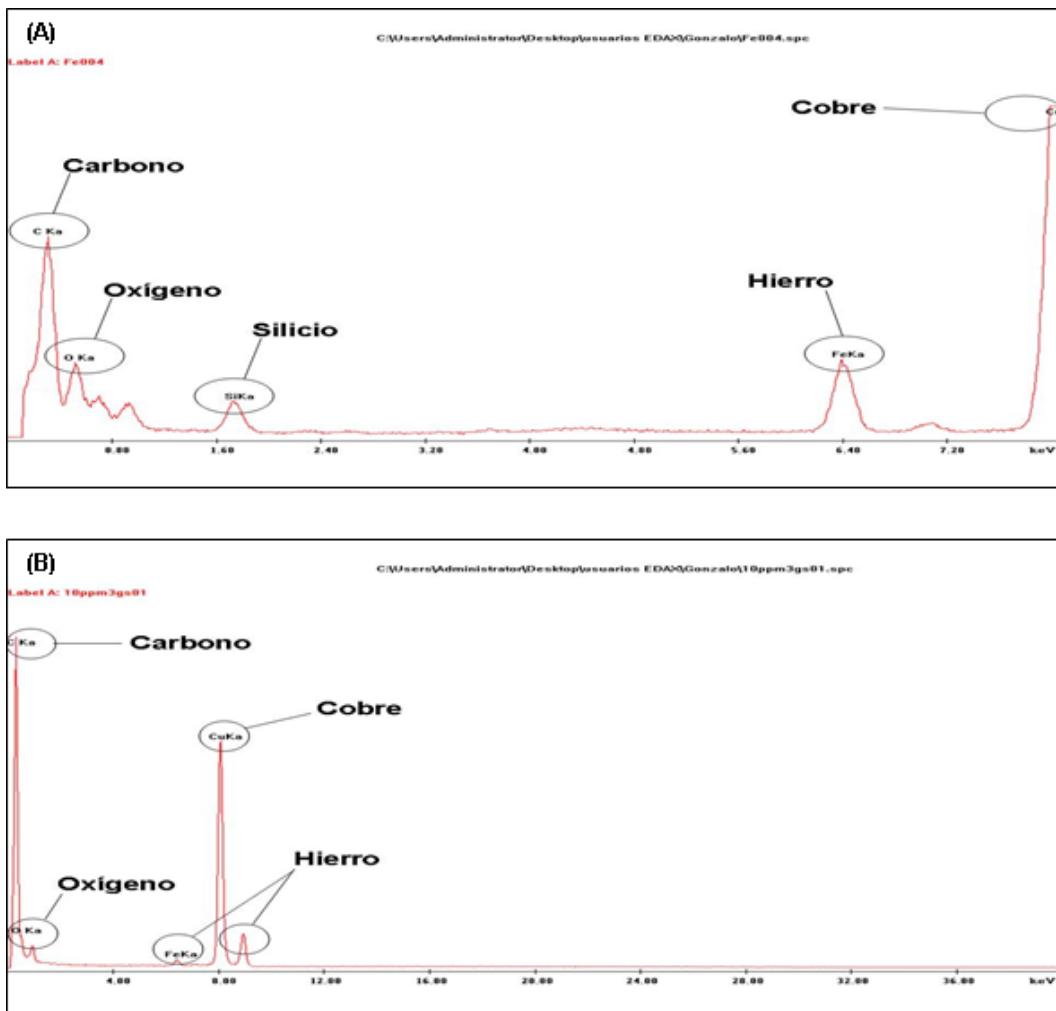


Fig. 32. Espectros de energía dispersiva de rayos X (Cuentas vs Energía KeV). **(A)** NPs de la suspensión comercial. **(B)** NPs de la suspensión de trabajo de 10 mg L^{-1} .

El tamaño de partícula también fue medido por DLS para una suspensión de NPs de concentración 2.500 mg L^{-1} , preparada a partir de la suspensión comercial en agua milli-Q y filtrada por membrana de PTFE de $0,22 \mu\text{m}$. El valor obtenido fue de $79 \pm 17 \text{ nm}$ (Fig. 33).

Además, la técnica utilizada permite obtener el valor de polidispersión (pdl, por sus siglas en inglés), el cual indica que existe un tamaño de partícula uniforme en suspensión si su valor es menor a 0,20. Para la suspensión analizada se obtuvo un valor de 0,19, lo que permitió concluir que la suspensión contenía partículas con tamaño homogéneo (Fig. 33).

Resultados

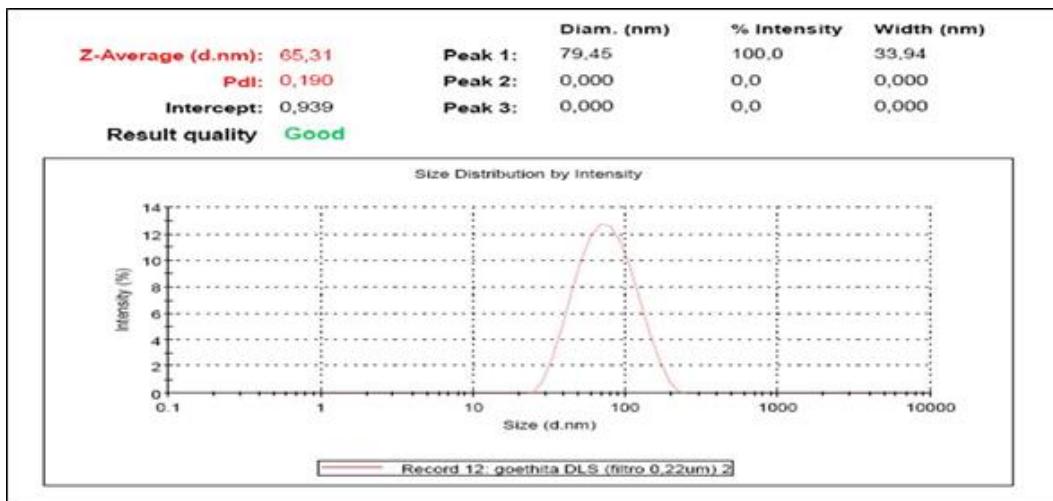


Fig. 33. DLS de NPs de la suspensión de 2.500 mg L^{-1} preparada a partir de la suspensión comercial.

Al igual que la suspensión comercial, el agua decolorada y la suspensión de trabajo fueron analizadas por DLS.

El agua decolorada utilizada para la preparación de la suspensión de NPs de 10 mg L^{-1} , fue filtrada por membrana de PTFE de $0,22 \mu\text{m}$ y el valor de tamaño de partícula obtenido fue de $311 \pm 12 \text{ nm}$ (Fig. 34A). El valor de polidispersión de 0,71 denotó una variabilidad significativa en el tamaño de las partículas encontrado.

La suspensión de trabajo de 10 mg L^{-1} sin filtrar por membrana de PTFE de $0,22 \mu\text{m}$ (Fig. 34B), arrojó un tamaño de partícula de $690 \pm 21 \text{ nm}$ y la misma suspensión filtrada por membrana de PTFE $0,22 \mu\text{m}$, presentó dos tamaños de partículas claramente definidos, de $109 \pm 9 \text{ nm}$ y de $601 \pm 70 \text{ nm}$ (Fig. 34C). El tamaño de 109 nm correspondería a las NPs de goethita y sólo pudo observarse luego de filtrar la solución de trabajo a través de la membrana de $0,22 \mu\text{m}$. El valor de polidispersión tanto para la muestra no filtrada como para la filtrada fue mayor a 0,2 lo cual evidenció heterogeneidad en el tamaño de partículas.

Resultados

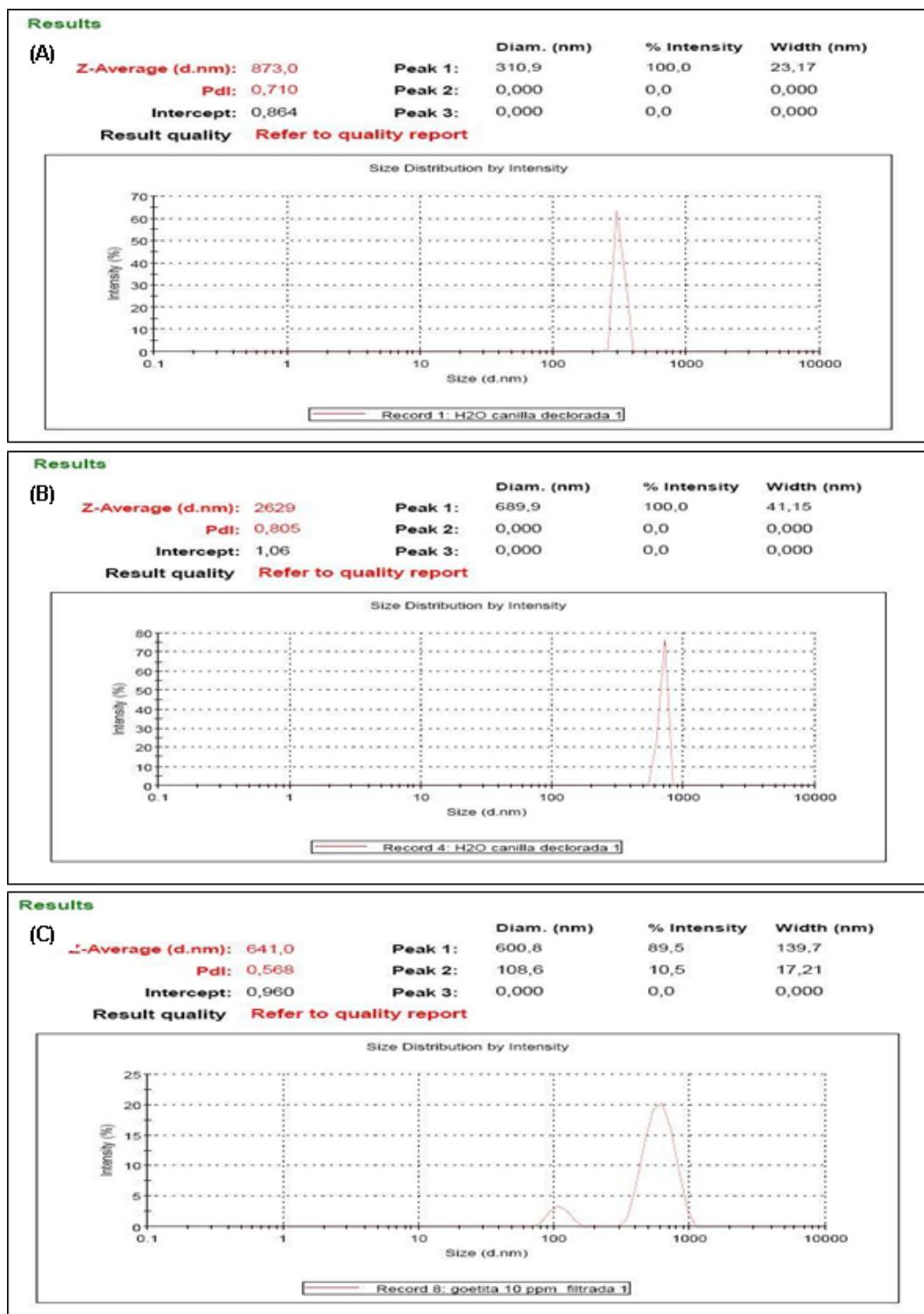


Fig. 34. (A) DLS del medio acuoso de trabajo filtrado por membrana de PTFE de 0,22 µm (Agua declorada). (B) DLS de la suspensión de trabajo sin filtrar. (C) DLS de la suspensión de trabajo filtrada por membrana de PTFE de 0,22 µm.

Resultados

El potencial Z se determinó en la suspensión de NPs de 10 mg L^{-1} en agua declorada, con el fin de evaluar su estabilidad.

Normalmente se considera que las partículas en suspensión son estables si el potencial Z es mayor a 30 mV o menor a -30 mV. En el rango entre 30 mV y -30 mV las partículas en suspensión se consideran inestables y en determinado tiempo interaccionarán y decantará.

El potencial Z obtenido para el agua declorada y para una suspensión de NPs de concentración 10 mg L^{-1} en agua declorada, se muestra en la Tabla 5.

| | Potencial Z (mV) |
|--|-------------------|
| Agua declorada | $-12,10 \pm 7,79$ |
| Suspensión de NPs 10 mg L^{-1} | $-20,40 \pm 3,73$ |

Tabla 5. Potencial Z del agua declorada y de la suspensión de NPs de goethita de concentración 10 mg L^{-1} .

Los valores de potencial Z obtenidos para el agua declorada y para la suspensión de NPs, nos indican que son suspensiones inestables. Estos resultados permiten concluir que en un cierto intervalo de tiempo las partículas interaccionarán en suspensión y decantará formando agregados de mayor tamaño.

El potencial Z del agua declorada se debe a las partículas presentes en suspensión y el potencial de la suspensión de NPs se puede atribuir a las partículas existentes en el agua declorada y a las NPs.

Por otro lado, se obtuvieron los espectros UV-Visible entre 200 nm y 500 nm, para la suspensión de trabajo (10 mg L^{-1}) a $t= 0 \text{ h}$ (recién preparada) y a $t= 48 \text{ h}$.

El espectro obtenido de la suspensión a $t= 0 \text{ h}$ presentó un pico a 290 nm de las NPs en cuestión (Fig. 35A). Sin embargo, el espectro obtenido de la misma suspensión a $t= 48 \text{ h}$, no presentó ningún pico a 290 nm (Fig. 35B).

La diferencia observada entre ambos espectros (a $t = 0$ y $t = 48$ h) obtenidos para la misma suspensión, nos indica que la misma se ve afectada en el intervalo de tiempo analizado. En la Fig. 36 se puede observar visualmente que después de las 48 h de la preparación de la suspensión, las NPs decantaron y por esta razón es que el pico obtenido a $t = 0$ h no se observó en el espectro obtenido a $t = 48$ h.

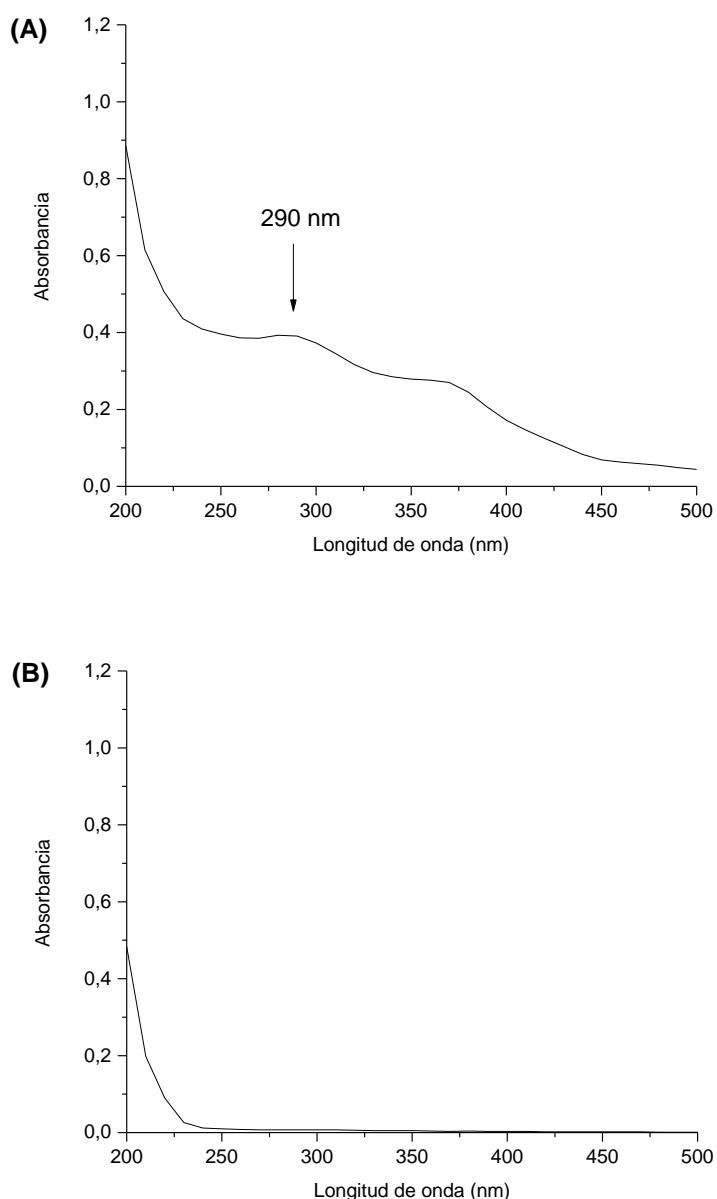


Fig. 35. Espectros UV-Visible entre 200 nm y 500 nm obtenidos para la suspensión de goethita de 10 mg L^{-1} . **(A)** $t = 0$ h. **(B)** $t = 48$ h.

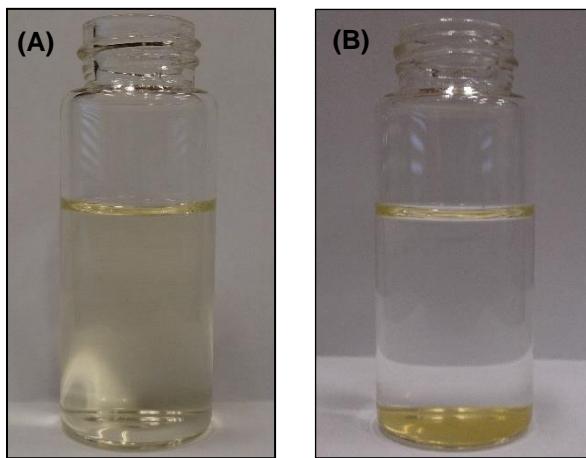


Fig. 36. (A) Suspensión de goethita de 10mg L^{-1} a $t= 0\text{ h}$. **(B)** Suspensión de goethita de 10mg L^{-1} a $t= 48\text{ h}$.

El comportamiento de las NPs (10 mg L^{-1}) a $t= 0\text{ h}$ y $t= 48\text{ h}$, también fue estudiado por espectroscopia UV-Visible en presencia de una concentración de 20 mg L^{-1} de ácidos húmicos (AH). De los espectros obtenidos se observó que:

- ✓ No se encontraron diferencias significativas entre los espectros obtenidos a $t= 0\text{ h}$ y $t= 48\text{ h}$ para la solución de 20 mg AH L^{-1} (Fig. 37A).
- ✓ Los espectros obtenidos de la suspensión de NPs a $t= 0\text{ h}$ y $t= 48\text{ h}$ en presencia de AH, no presentaron diferencias significativas, lo cual indicaría que las NPs no decantaron apreciablemente (Fig. 37B).

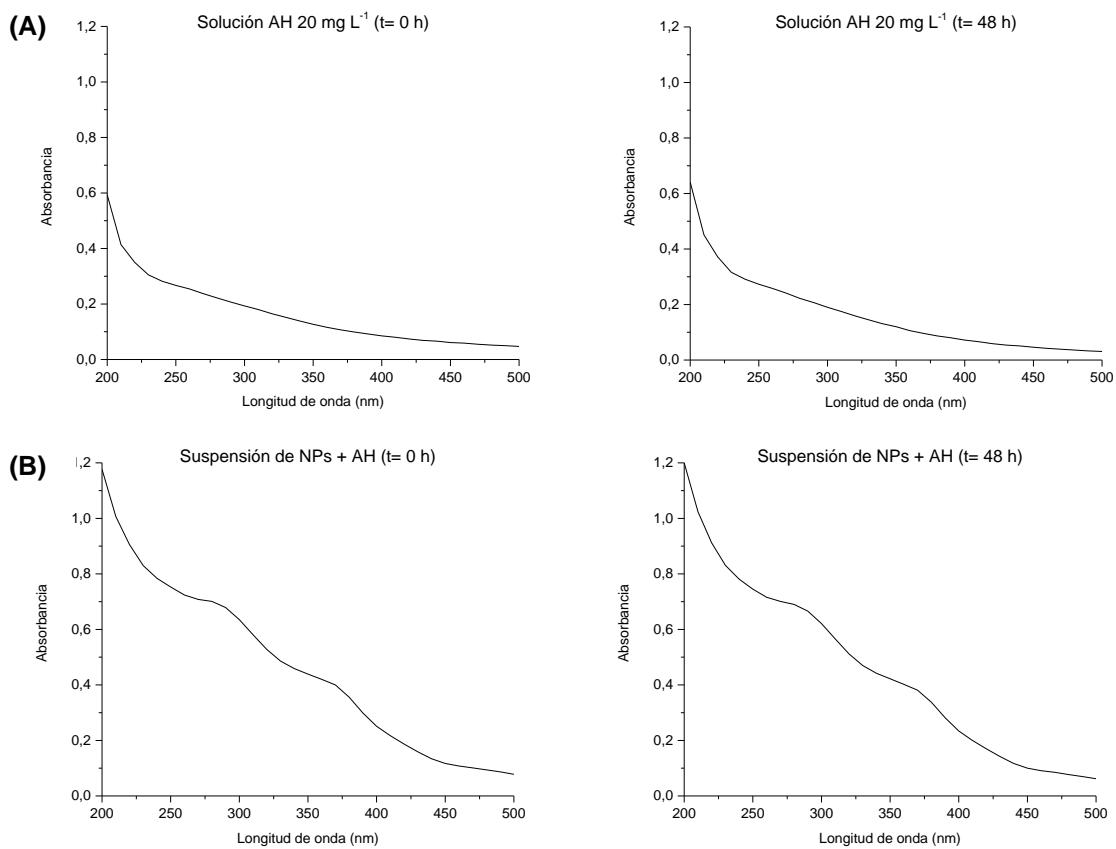


Fig. 37. Espectros UV-Visible a t= 0 h y t= 48 h. **(A)** Solución de AH (20 mg L⁻¹). **(B)** Suspensión de goethita (10 mg L⁻¹) en presencia de AH (20 mg L⁻¹).

En la Fig. 38, se pueden visualizar las suspensiones de NPs y de NPs + AH a t= 0 h y t= 48 h. A las 48 h las NPs se encontraron en gran proporción sedimentadas. En cambio, en la suspensión de la mezcla no se evidenció ninguna decantación apreciable de NPs.

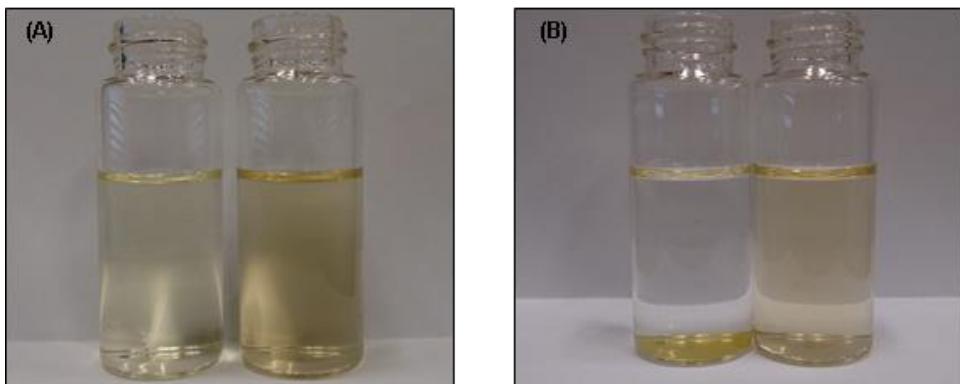


Fig. 38. (A) Suspensiones a $t = 0$ h de NPs 10 mg L^{-1} (izquierda) y de NPs 10 mg L^{-1} + AH 20 mg L^{-1} (derecha). (B) Suspensiones a $t = 48$ h de NPs 10 mg L^{-1} (izquierda) y de NPs 10 mg L^{-1} + AH 20 mg L^{-1} (derecha).

9.2. Magnetita

Las imágenes obtenidas por TEM mostraron que las NPs contenidas en la suspensión comercial, de concentración 5 mg L^{-1} en medio acuoso, poseen morfología consistente con magnetita (estructura cristalina de forma granular) y un tamaño de partícula de $10 \pm 2 \text{ nm}$, medido en su eje más largo (Fig. 39).

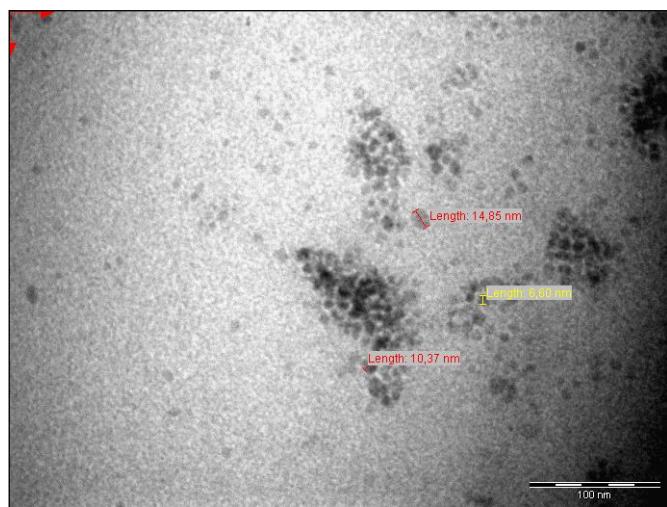


Fig. 39. Imagen obtenida por TEM de la suspensión comercial de magnetita. Escala: 100 nm .

Resultados

Por otro lado, el patrón de difracción permitió observar la estructura cristalina de la magnetita, en la suspensión comercial (Fig. 40).



Fig. 40. Patrón de difracción de la suspensión comercial de magnetita.

Del EDAX se determinó que las NPs están constituidas por Fe y O (Fig. 41). La presencia de Cu y C, como se explicó anteriormente, son impurezas provenientes de la grilla. Los elementos Na y Cl en la Fig. 41, se deberían a sales presentes en el medio.

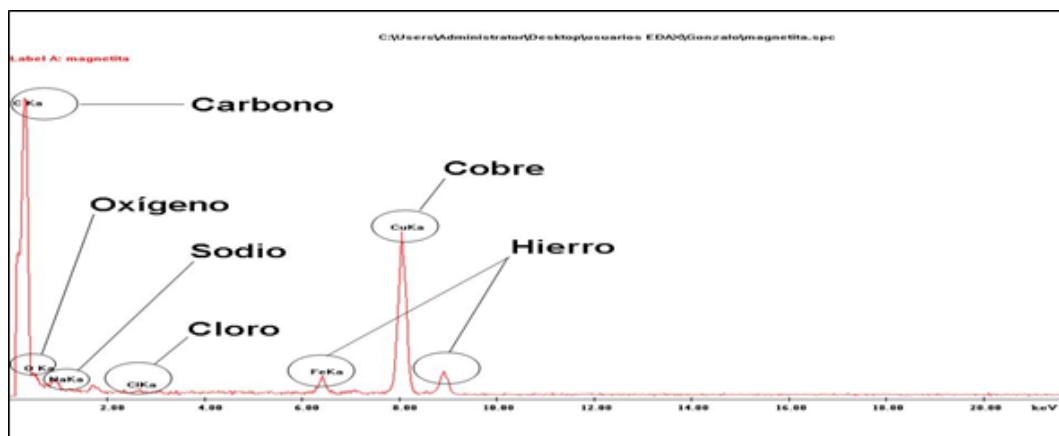


Fig. 41. Espectro de energía dispersiva de rayos X (Cuentas vs Energía KeV) de la suspensión comercial de magnetita.

9.3. Puesta a punto de la determinación de hierro por AAS

Se estudió si la digestión de NPs de goethita y magnetita con ácido nítrico concentrado (HNO_3) en presencia y ausencia de tejido biológico y la posterior medición de Fe podía utilizarse para estimar la concentración inicial de exposición y para estudiar la incorporación de NPs en los organismos acuáticos mediante la cuantificación del metal.

Los valores de Fe hallados en solución luego de digerir durante 8 h, se muestran en la Tabla 6. Los valores experimentales no difirieron significativamente con respecto a los valores nominales, lo cual indicó que dicha metodología era apropiada para los fines propuestos ($p>0,05$).

Una vez caracterizadas las NPs y establecidas las condiciones experimentales para determinar los niveles de Fe, se procedió con la realización de los bioensayos con *L. variegatus* y *B. glabrata*.

| | Valor Nominal (mg L ⁻¹) | Valor Experimental (mg L ⁻¹) |
|--|--|---|
| Goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$) | 6,3 | $6,3 \pm 0,3$ |
| Goethita + tejido <i>L. variegatus</i> | 6,3 | $6,6 \pm 0,6$ |
| Goethita + tejido <i>B. glabrata</i> | 6,3 | $6,0 \pm 0,4$ |
| Magnetita (Fe_3O_4) | 5,2 | $4,8 \pm 0,3$ |
| Magnetita + tejido <i>L. variegatus</i> | 5,2 | $5,0 \pm 0,5$ |

Tabla 6. Valores de Fe hallados luego de digerir las NPs por 8 h, en presencia y ausencia de tejido biológico. El valor nominal se refiere al valor teórico de Fe que debía esperarse si la digestión de las NPs fuera completa. El valor experimental es el valor de Fe obtenido luego de aplicar la metodología de análisis.

10. *Lumbriculus variegatus*

10.1. Incorporación de NPs de goethita

Se estudió la incorporación de NPs de goethita variando el tiempo de depuración (Fig. 42). Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de Fe encontrados en organismos expuestos a NPs sin depurar ($t_{depuración} = 0 \text{ h}$) o en aquellos depurados por 4 h, son significativamente mayores con respecto a los encontrados en los organismos controles (100 % y 59 %, respectivamente) ($p < 0,05$). Sin embargo, luego de 16 h de depuración los niveles de Fe en los organismos expuestos a NPs eran similares a los de los organismos controles ($p > 0,05$).

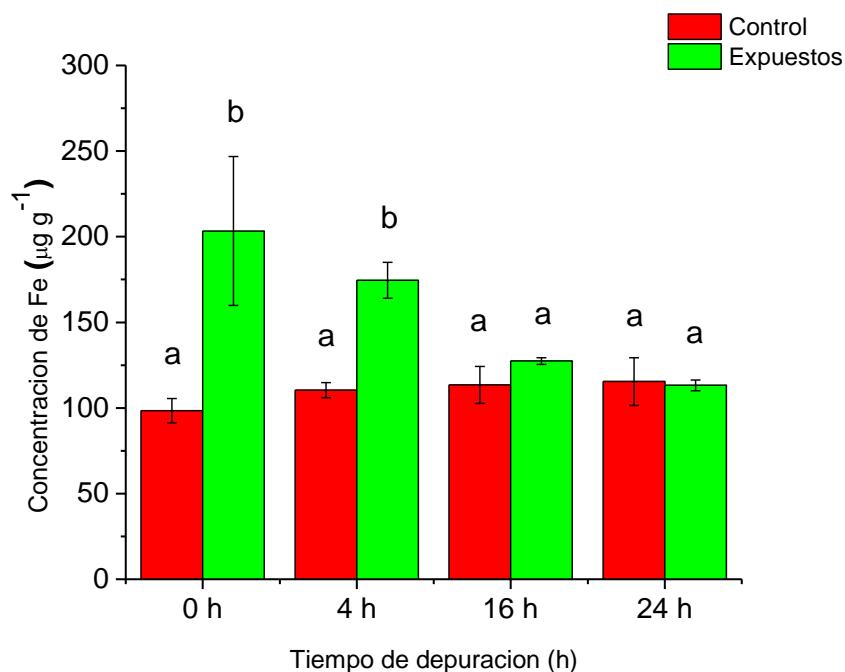


Fig. 42. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *L. variegatus*, a diferentes tiempos de depuración, de organismos expuestos por 48 h en medio acuoso, en ausencia de NPs de goethita (Control) y de organismos expuestos por 48 h a suspensiones de 10 mg NPs L⁻¹ (Expuestos). **0 h:** organismos sin depurar. **4 h:** organismos depurados por 4 h. **16 h:** organismos depurados por 16 h. **24 h:** organismos depurados por 24 h.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Por otro lado, la incorporación de NPs de goethita también fue estudiada variando el tiempo de exposición (Fig. 43). En este caso, los organismos se depuraron siempre por 24 h. Los resultados mostraron que los niveles de Fe en los organismos no se modificaron con respecto a los niveles de Fe basales presentado por los controles ($p<0,05$).

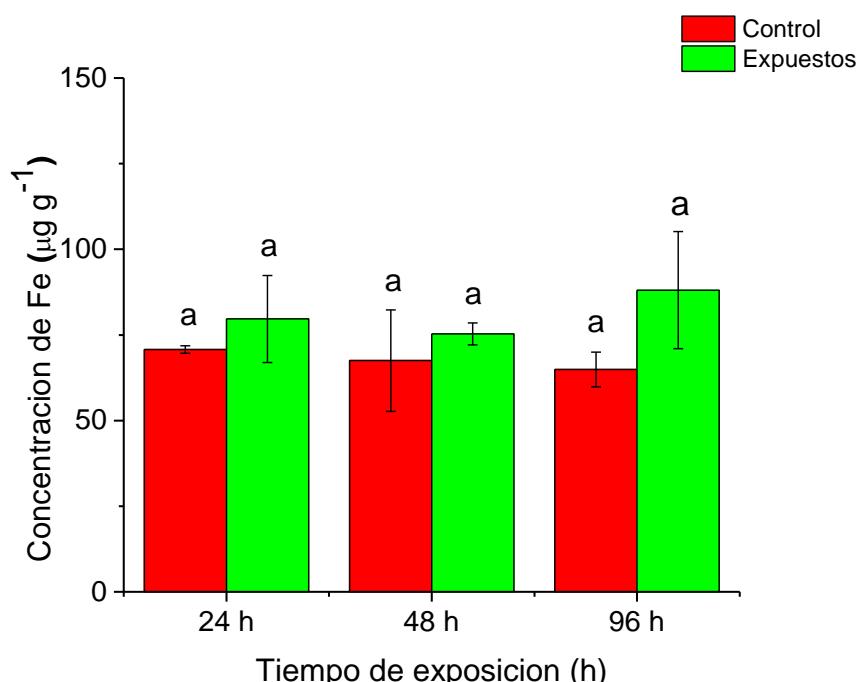


Fig. 43. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *L. variegatus*, a diferentes tiempos de exposición, de organismos expuestos al medio acuoso, en ausencia de NPs de goethita (Control) y de organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de concentración 10 mg L^{-1} (Expuestos), depurados por 24 h. **24 h:** organismos expuestos por 24 h. **48 h:** organismos expuestos por 48 h. **96 h:** organismos expuestos por 96 h.

10.2. Efectos subcelulares en presencia de NPs de goethita

Se optimizó la metodología para evaluar la capacidad antioxidante total (TOSC) tanto frente a radicales peroxilos como hidroxilos. El primer paso fue identificar el tiempo de retención del etileno. En la Fig. 44, se puede observar el cromatograma obtenido del espacio-cabeza para un patrón de etileno puro, en el cual se observó un único pico a tiempo de retención 2,8 minutos.

Resultados

Simultáneamente, se realizaron blancos de inyección, los cuales no presentaron picos durante el tiempo de corrida.

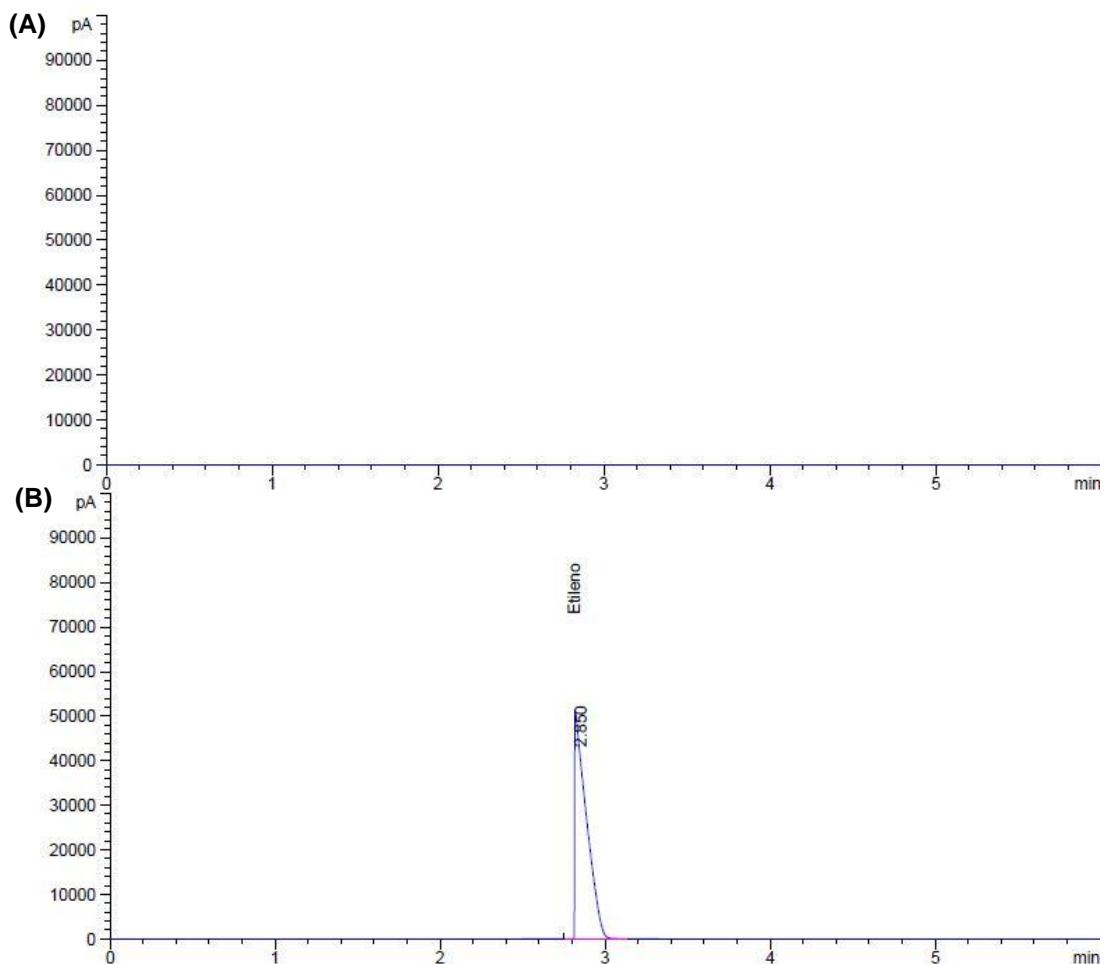


Fig. 44. Cromatogramas obtenidos del espacio-cabeza. **(A)** Blanco de inyección. **(B)** Etíleno puro.

En segundo lugar, se estudió la generación de etíleno, por ruptura del KMBA, inducida por radicales peroxilos e hidroxilos generados *in situ*. Para esto, se prepararon viales controles conteniendo todos los reactivos necesarios para la generación de etíleno para cada radical de estudio y se calentaron por 15 minutos a 35 °C. Posteriormente, se inyectó en el GC-FID, 0,5 mL del espacio-cabeza de cada vial y se comparó con el chromatograma obtenido para el patrón puro de etíleno. En la Fig. 45, se pueden observar los chromatogramas del espacio-cabeza, obtenidos de la generación de etíleno a partir de radicales

Resultados

peroxilos y de radicales hidroxilos. En ambos cromatogramas se pudo identificar la presencia de un pico con tiempo de retención igual al del tiempo de retención del etileno puro.

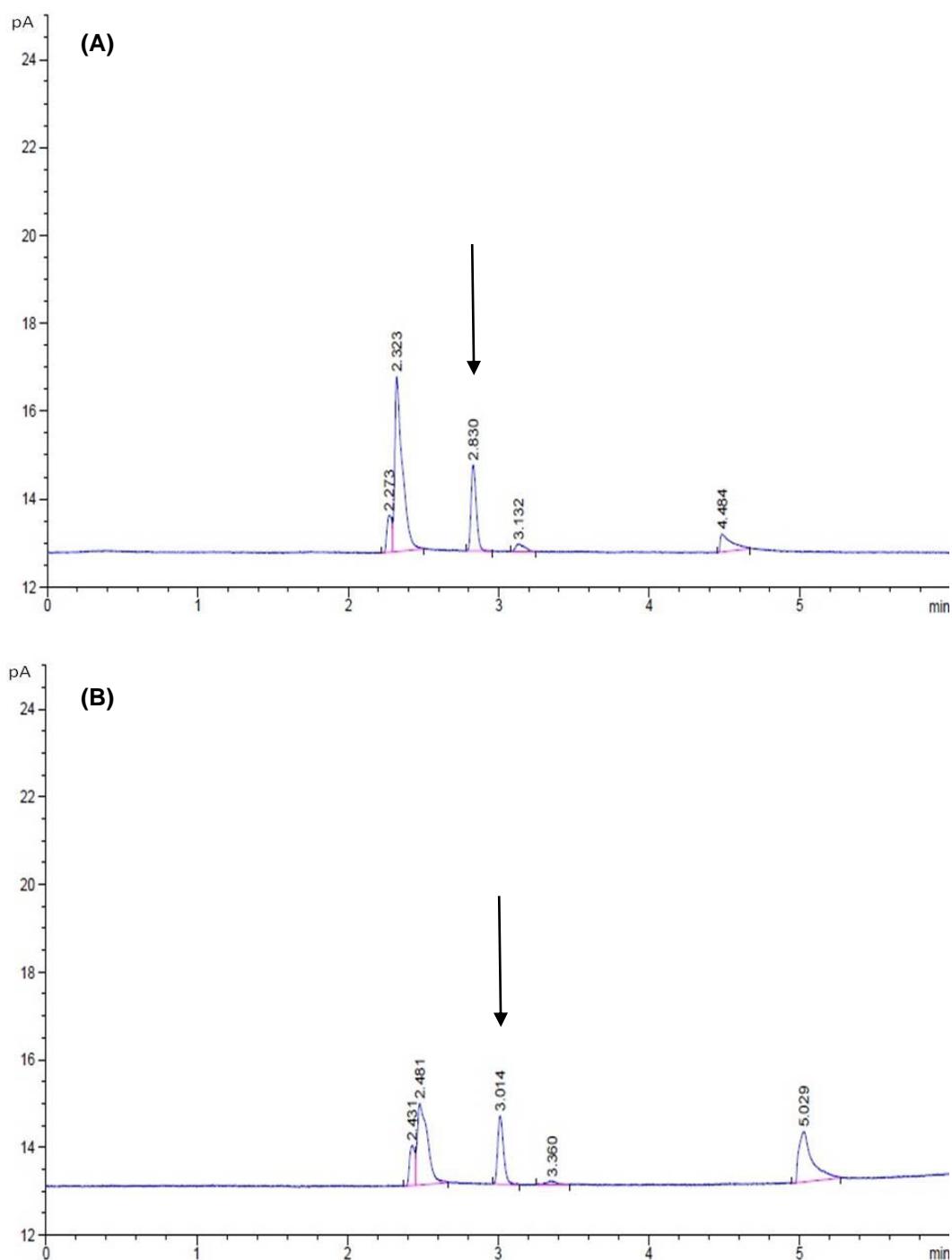


Fig. 45. Cromatogramas obtenidos del espacio-cabeza para los controles termostatizados a 35 °C durante 15 minutos. **(A)** Generación de etileno a partir de radicales peroxilos. **(B)** Generación de etileno a partir de radicales hidroxilos.

El siguiente paso fue evaluar la cinética de generación de etileno al variar el tiempo de termostatización. Para esto, se realizaron curvas control para cada radical estudiado (conteniendo todos los reactivos en ausencia de material biológico). De los cromatogramas, se obtuvieron las áreas de los picos y se graficó el área en función del tiempo de termostatización para ambos radicales. En la Fig. 46 se puede observar que los puntos obtenidos se pueden ajustar a una función polinomial de segundo orden (Ecuación 2) para ambos radicales.

$$Y = B_2 X^2 + B_1 X + B_0$$

Ecuación 2. Función polinomial de segundo orden.

Para el caso de los radicales hidroxilos también se puede aproximar por una recta (el valor del coeficiente B_2 es muy bajo), pero se decidió ajustar ambos casos por una polinomial de segundo orden.

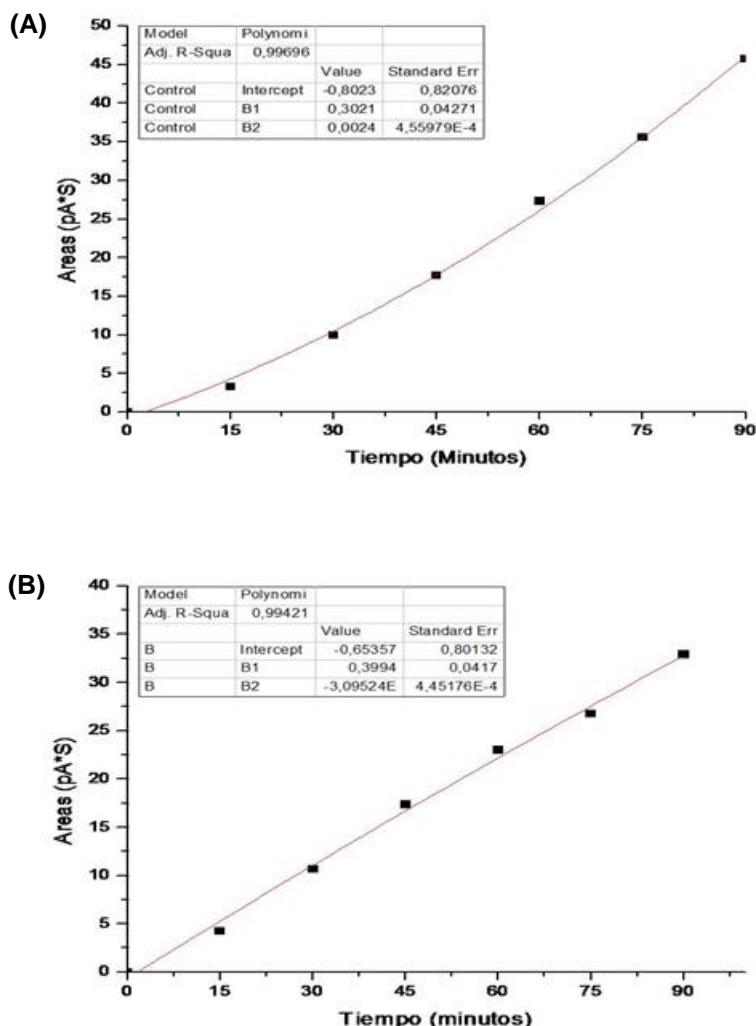


Fig. 46. Gráficos áreas (pA*S) vs tiempo de termostatización (minutos), obtenidos para el control de reacción. **(A)** Curva control de reacción empleando radicales peroxilos como generadores de etileno. **(B)** Curva control de reacción empleando radicales hidroxilos como generadores de etileno.

Por último, se determinó la cantidad de homogenato (en relación a la cantidad de proteínas) necesaria para la evaluación de la capacidad antioxidante total. Para esto, se prepararon viales con distintas cantidades de homogenatos y se compararon con viales control (conteniendo todos los reactivos, en ausencia de homogenato). Estas determinaciones fueron realizadas mediante 45 minutos de calentamiento a 35 °C, condiciones correspondientes al punto medio de la curva obtenida en la Fig. 46. Estos análisis se efectuaron para la generación de etileno a partir de radicales peroxilos.

Resultados

En la Fig. 47 se pueden observar los cromatogramas del espacio-cabeza de un vial control, y de un vial conteniendo 97 µg de proteínas, el cual corresponde a la cantidad elegida para la evaluación del valor de TOSC de *L. variegatus* expuestos a NPs de goethita. La diferencia de áreas obtenidas para el pico de etileno, entre los viales control (100 % de etileno capaz de ser generado por ruptura del KMBA por acción de radicales peroxilos generados *in situ*) y los viales con 97 µg de proteínas, fue de 74 % aproximadamente. Esa diferencia nos permitió tener un amplio rango para evaluar la posible pérdida de la capacidad antioxidante de los organismos expuestos, ya que, si ésta se ve afectada de forma negativa por la presencia de NPs, la generación de etileno debería estar comprendida entre el área del control de reacción y del organismo no expuesto a NPs.

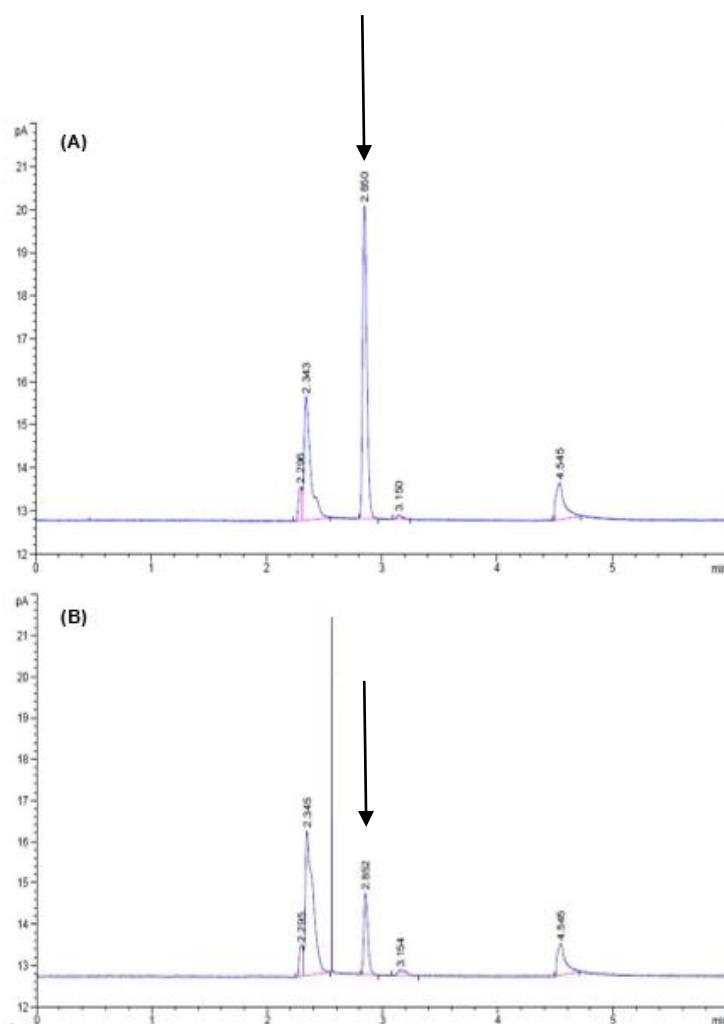


Fig. 47. Cromatogramas obtenidos del espacio-cabeza con 45 minutos de calentamiento a 35 °C. **(A)** Vial control empleando radicales peroxilos para la generación de etileno. **(B)** Vial con homogenato (97 µg de proteínas) empleando radicales peroxilos para la generación de etileno.

Resultados

La misma cantidad de homogenato fue utilizada para la determinación del valor de TOSC frente a radicales hidroxilos.

Para obtener la capacidad antioxidante total de organismos expuestos a NPs de goethita y compararla con organismos no expuestos a NPs, se analizaron curvas controles, curvas con homogenatos de organismos que no fueron expuestos a NPs (97 µg de proteínas) y curvas con homogenatos (97 µg de proteínas) de organismos que previamente fueron expuestos a NPs de goethita (Fig. 48).

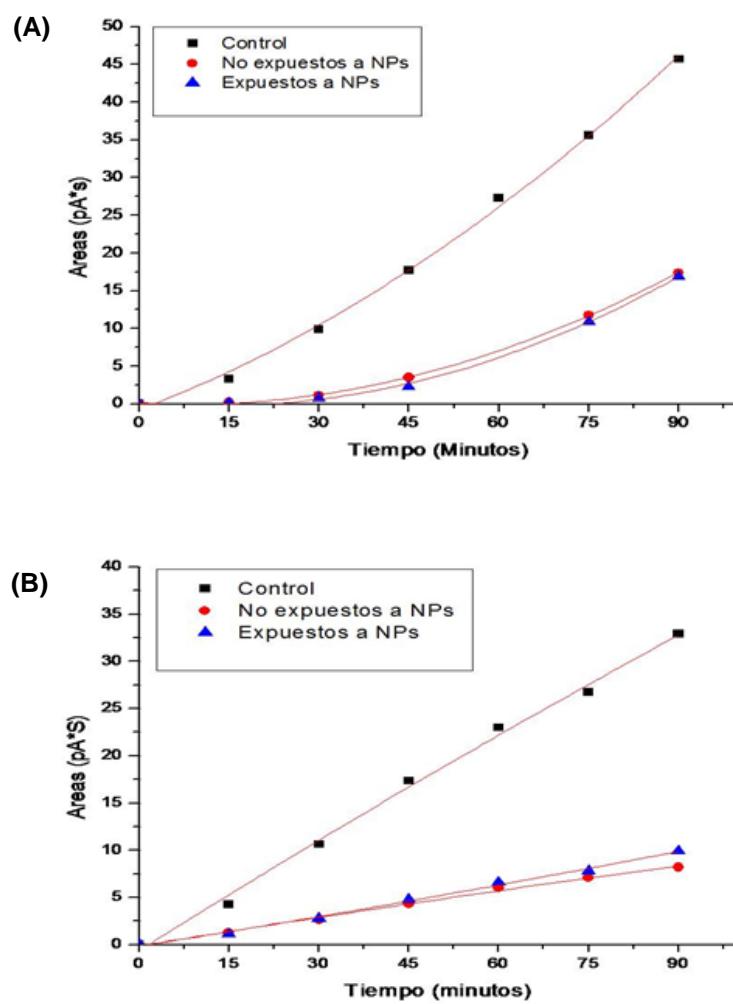


Fig. 48. Gráficos Área (pA*S) vs Tiempo de termostatización (minutos) del control de reacción, empleando tejido de *L. variegatus* no expuestos a NPs y empleando tejido de *L. variegatus* expuestos a NPs. **(A)** capacidad antioxidante total frente a radicales peroxilos. **(B)** capacidad antioxidante total frente a radicales hidroxilos.

Resultados

Luego, con las áreas bajo la curva se calculó la capacidad antioxidante total porcentual según la Ecuación 3.

$$TOSC\% = 100 - 100 \times \frac{A_H}{A_C}$$

Ecuación 3. Fórmula para el cálculo del valor de TOSC porcentual.

siendo:

TOSC %: La capacidad antioxidante total expresada en porcentaje.

A_H: El área bajo la curva obtenida para los organismos expuestos a NPs y no expuestos.

A_C: El área bajo la curva obtenida para el control de reacción.

Posteriormente se observó que el valor de TOSC % no se modificó significativamente ($p>0,05$), entre los organismos expuestos y los no expuestos a NPs de goethita, ya sea frente a radicales peroxilos como hidroxilos (Fig. 49).

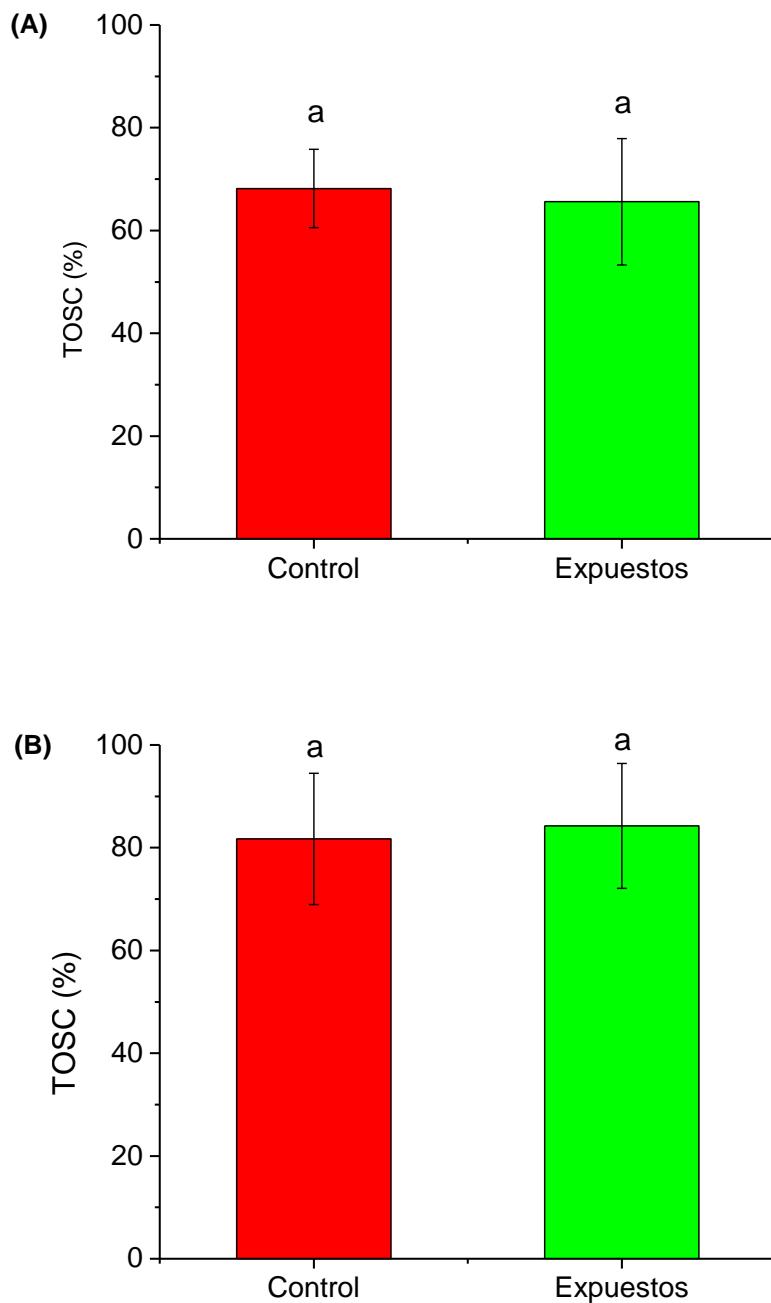


Fig. 49. Valor promedio (\pm DE) de TOSC % obtenido para organismos expuestos en ausencia (control) y en presencia de NPs de goethita (expuestos), durante 48 h y sin depurar. **(A)** TOSC % evaluado para radicales peroxilos. **(B)** TOSC % evaluado para radicales hidroxilos.

Además, se determinó la peroxidación de lípidos en los organismos expuestos. Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto a organismos controles (Fig. 50).

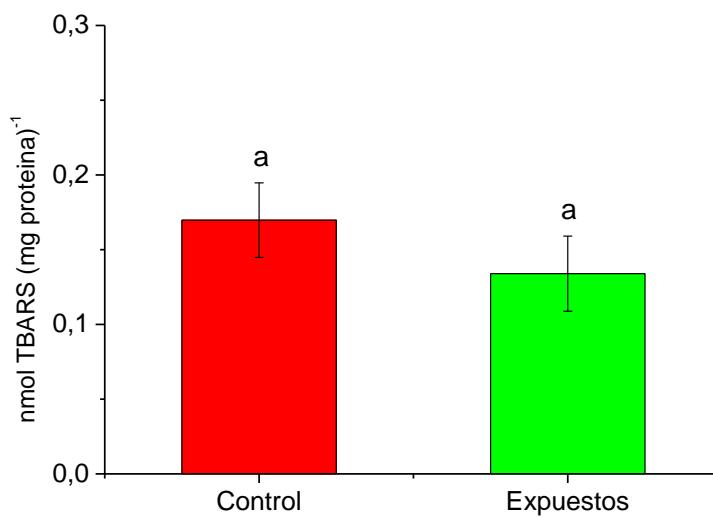


Fig. 50. Valor medio (\pm DE) de TBARS (nmol TBARS mg proteína $^{-1}$), en *L. variegatus*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de goethita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L $^{-1}$.

Por otra parte, se determinó la actividad de acetilcolinesterasa (AChE). La misma no presentó diferencias significativas ($p>0,05$) entre los organismos expuestos a NPs y los controles (Fig. 51).

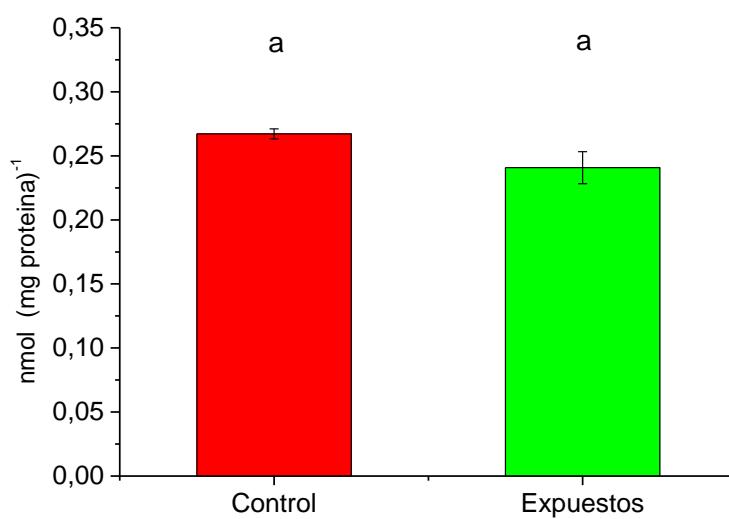


Fig. 51. Valor medio (\pm DE) de la actividad de AChE (nmol mg proteína $^{-1}$), en *L. variegatus*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de goethita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L $^{-1}$.

10.3. Incorporación de NPs de magnetita

La concentración de Fe hallada en los organismos expuestos a 10 mg L⁻¹ de NPs de magnetita y depurados por 24 h, no varió significativamente con respecto a los niveles de Fe presentes en los controles, luego de 24 h, 48 h y 96 h de exposición ($p>0,05$) (Fig. 52).

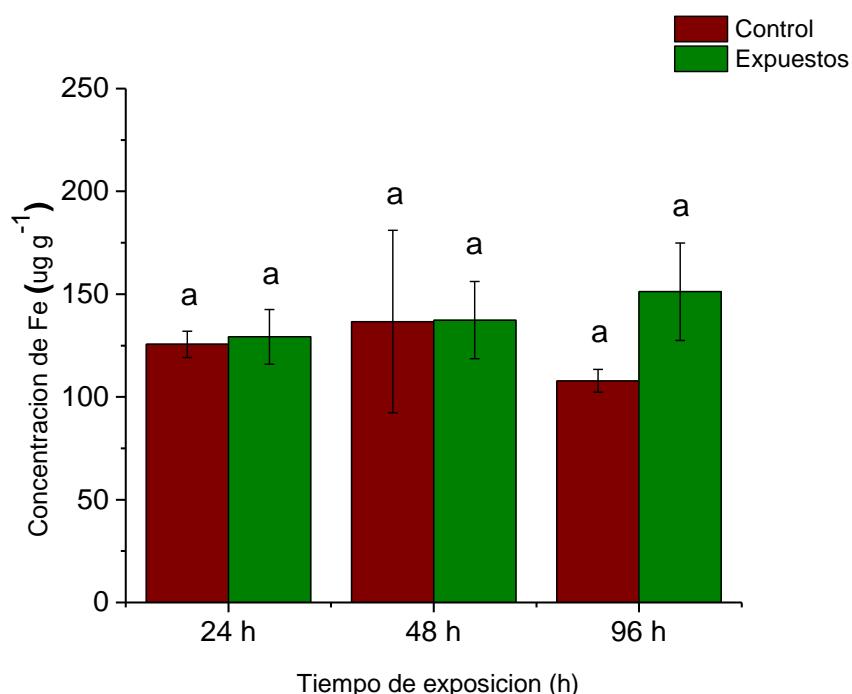


Fig. 52. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *L. variegatus*, a diferentes tiempos de exposición, de organismos expuestos al medio acuoso, en ausencia de NPs de magnetita (Control) y de organismos expuestos por 24 h, 48 h y 96 h a una suspensión de NPs de magnetita de concentración 10 mg L⁻¹.

10.4. Efectos subcelulares en presencia de NPs de magnetita

Se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) luego de exponer los organismos durante 48 h a suspensiones de 10 mg L⁻¹ de NPs. En la Fig. 53 se puede observar que no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles ($p>0,05$).

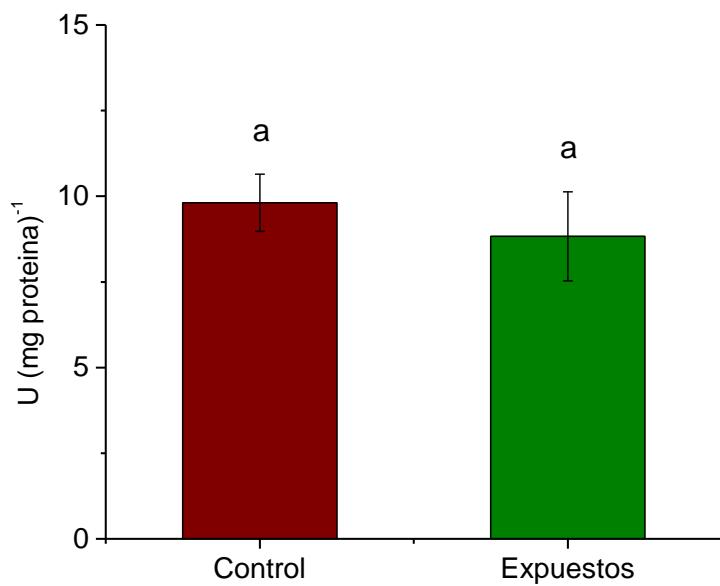


Fig. 53. Valor medio (\pm DE) de la actividad de la enzima SOD (U mg proteína $^{-1}$), en *L. variegatus*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de magnetita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de magnetita de 10 mg L $^{-1}$.

En las mismas condiciones de ensayo, se determinó la actividad de la enzima catalasa (CAT). Los resultados mostraron que tampoco había diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto a los controles (Fig. 54).

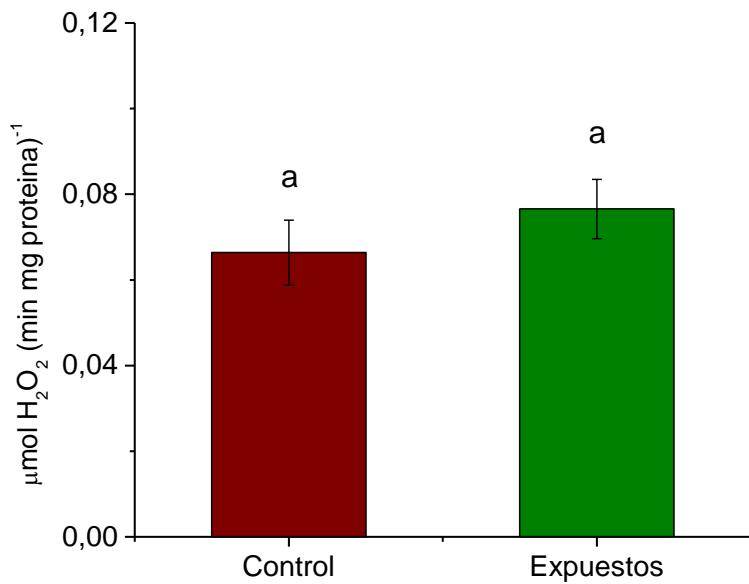


Fig. 54. Valor medio (\pm DE) de la actividad de la enzima CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 (\text{min mg proteína})^{-1}$), en *L. variegatus*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de magnetita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de magnetita de 10 mg L^{-1} .

Además, se determinaron los niveles de glutatión totales (t-GSH), los cuales no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los organismos expuestos y los controles (Fig. 55).

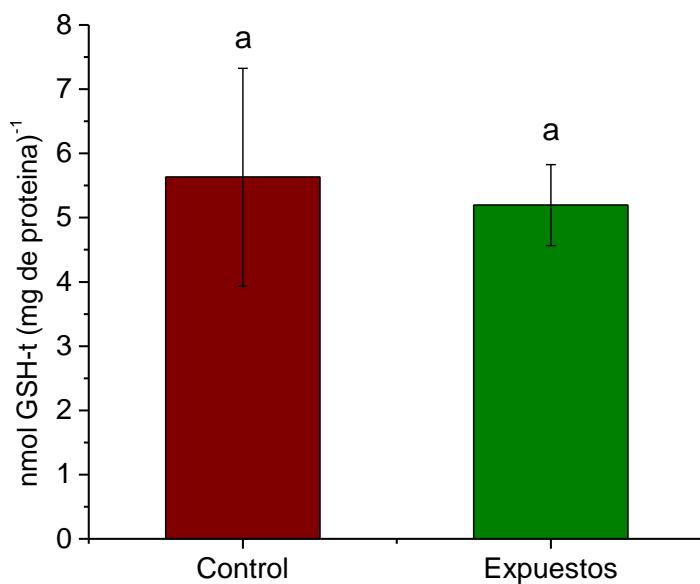


Fig. 55. Valor medio (\pm DE) de los niveles de glutatión (nmol GSH-t mg proteína⁻¹), en *L. variegatus*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de magnetita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de magnetita de 10 mg L⁻¹.

Por otro lado, el valor de TOSC porcentual no evidenció cambios significativos ($p>0,05$) entre los organismos expuestos a NPs con respecto a los controles, ya sea frente a radicales peroxilos como hidroxilos (Fig. 56).

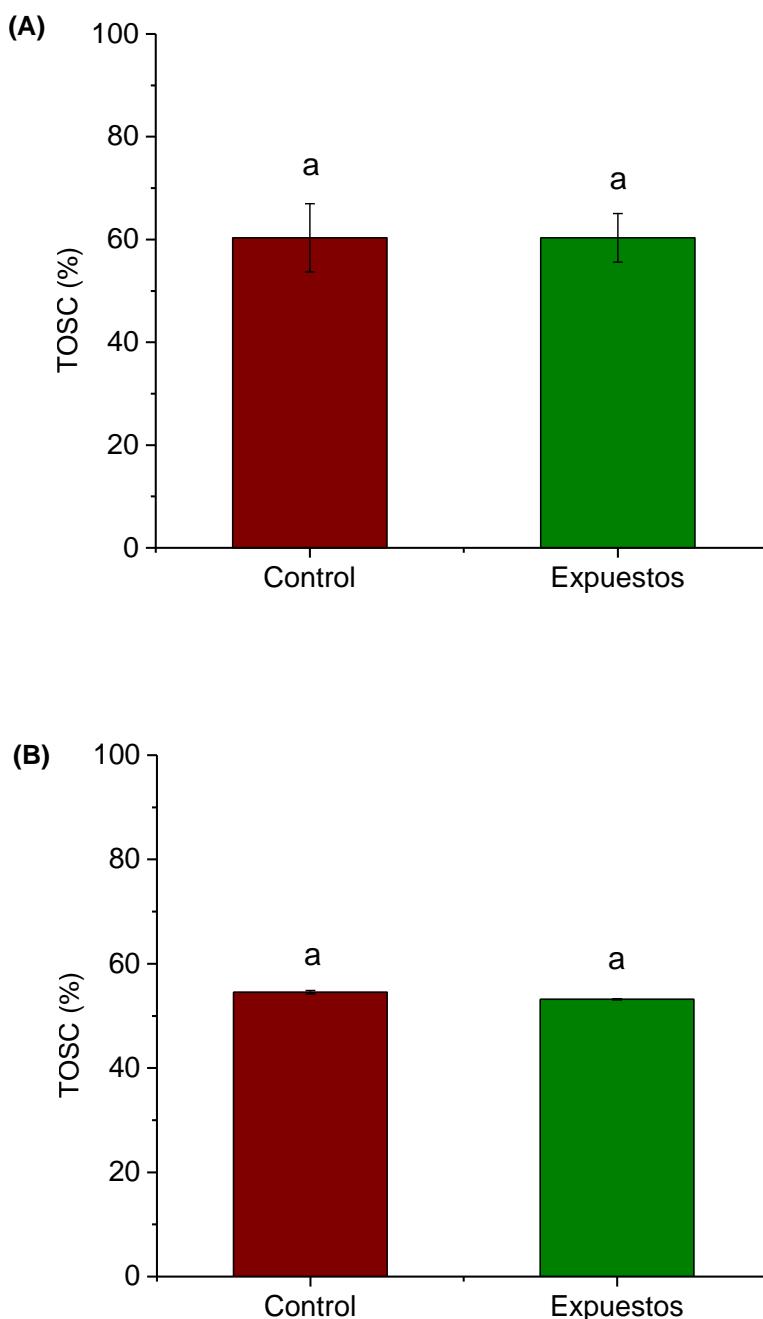


Fig. 56. Valor promedio (\pm DE) de TOSC % obtenido para *L. variegatus* expuestos en ausencia (control) y en presencia de NPs de magnetita (expuestos), durante 48 h y sin depurar. (A) TOSC % evaluada para radicales peroxilos. (B) TOSC % evaluada para radicales hidroxilos.

También se estudió la peroxidación de lípidos y no se encontraron variaciones significativas ($p>0,05$) entre los organismos expuestos y los controles (Fig. 57).

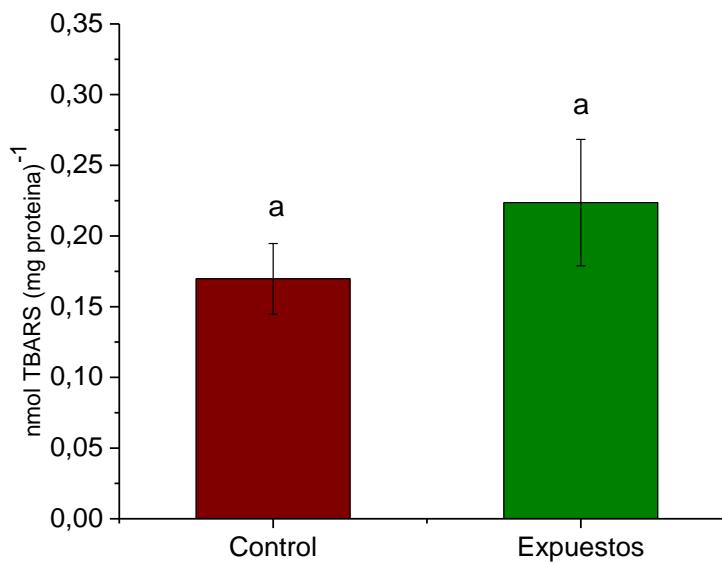


Fig. 57. Valor medio (\pm DE) de TBARS (nmol TBARS mg proteína⁻¹), en *L. variegatus*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de magnetita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de magnetita de 10 mg L⁻¹.

Finalmente, se estudió la actividad de AChE (Fig. 58). Los resultados mostraron que no había diferencias significativas al exponer a los organismos a NPs de magnetita con respecto a los controles ($p>0,05$).

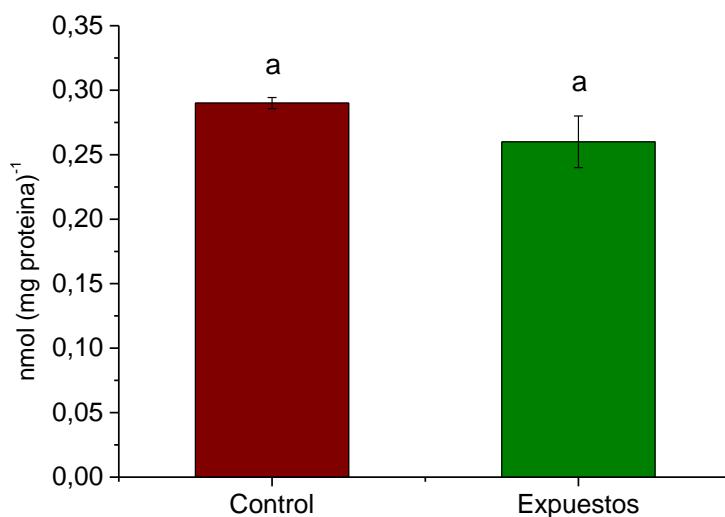


Fig. 58. Valor medio (\pm DE) de la actividad de AChE (nmol mg proteína $^{-1}$), en *L. variegatus*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de magnetita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de magnetita de 10 mg L $^{-1}$.

11. *Biomphalaria glabrata*

11.1. Incorporación de NPs de goethita

Al exponer los gasterópodos por 48 h a NPs (10 mg L $^{-1}$) y depurarlos por 4 h o 24 h, la concentración de Fe hallada fue significativamente mayor con respecto a los organismos controles ($p<0,05$). El aumento de la concentración de Fe observado fue de aproximadamente 500 % con respecto a los basales (Fig. 59).

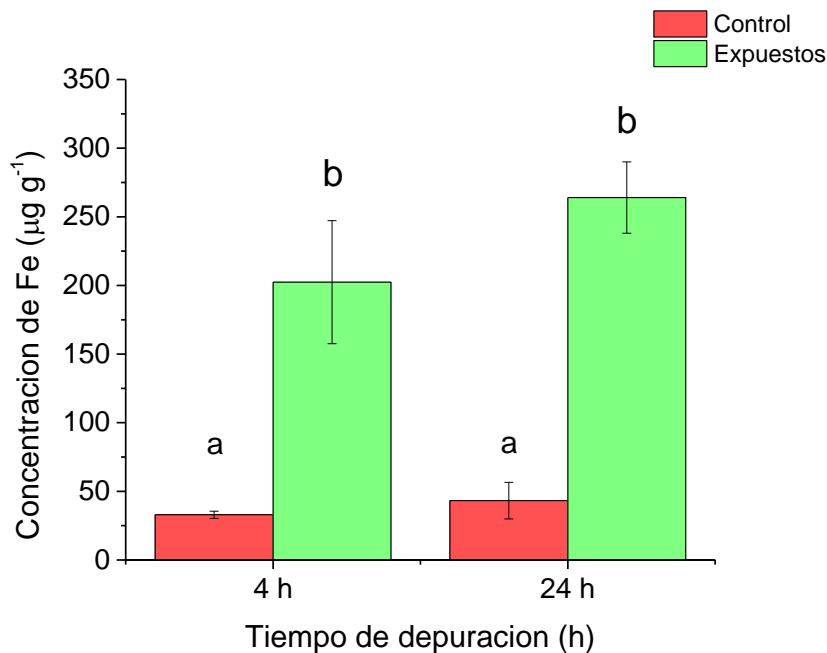


Fig. 59. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en el tejido blando total de *B. glabrata*, expuestos por 48 h y depurados por 4 h o 24 h.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

Seguidamente, se estudió el efecto del tiempo de depuración de NPs sobre los niveles de Fe en distintas regiones anatómicas (céfalo-pedal, pulmonar + digestiva + gonadal, hemolinfa) de *B. glabrata* luego de ser expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs por 48 h.

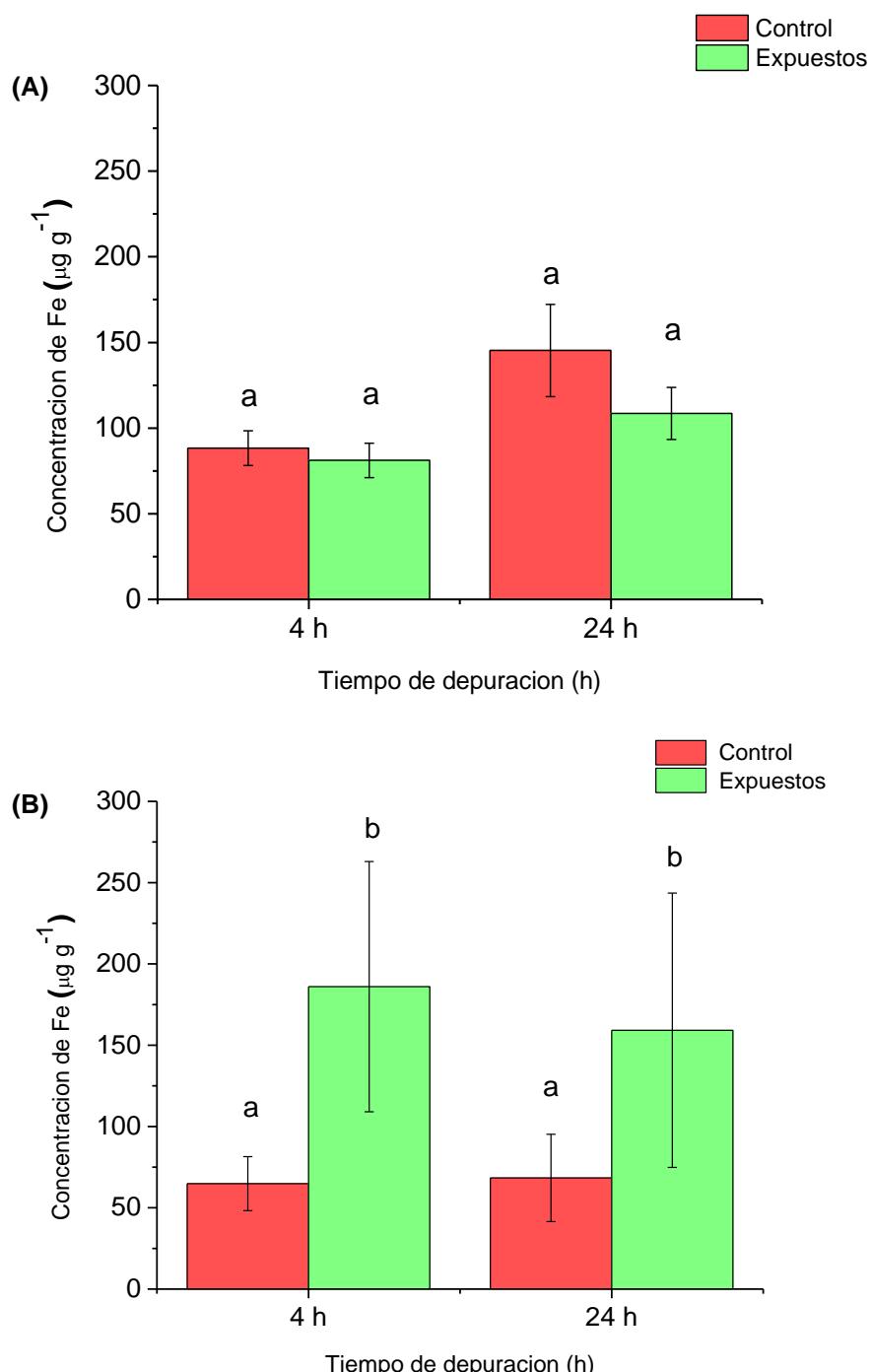
En la Fig. 60A, se observó que en la región céfalo-pedal, la concentración de Fe no difería significativamente ($p>0,05$) entre los organismos controles y los organismos expuestos, a ambos tiempos de depuración.

En la región pulmonar + digestiva + gonadal, se encontró que los niveles de Fe aumentaron significativamente ($p<0,05$) en los organismos expuestos a NPs con respecto a los controles, a las 4 h y 24 h de depuración. Por otra parte, se puede observar que el nivel de Fe de los organismos expuestos se mantuvo sin diferencias significativas ($p>0,05$) durante los tiempos de depuración estudiados (Fig. 60B).

La concentración de Fe en la hemolinfa aumentó significativamente ($p<0,05$) en los organismos expuestos a NPs con respecto a los controles, luego de 4h de

Resultados

depuración. En cambio, los valores retornaron a los niveles basales tras un período de 24 h de depuración ($p>0,05$) (Fig. 60C).



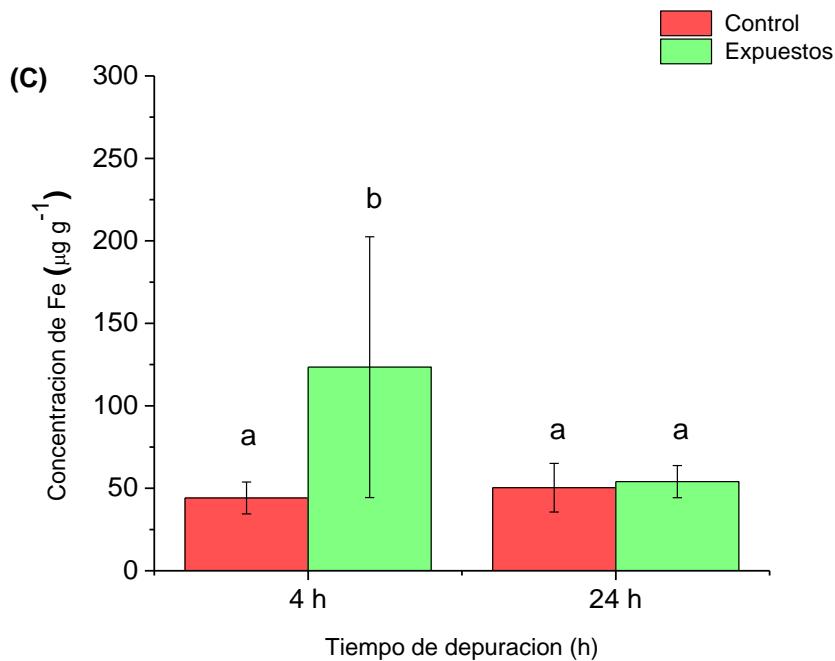


Fig. 60. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en las distintas regiones anatómicas de *B. glabrata*, expuestos por 48 h y depurados a 4 o 24 h. **(A)** Región céfalo-pedal. **(B)** Región pulmonar + digestiva + gonadal. **(C)** Hemolinfa.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

Por otro lado, se estudió la posible variación de los niveles de Fe en función del tiempo de exposición en gasterópodos expuestos por 48 h o 96 h y depurados por 24 h (Fig. 61). Los resultados mostraron que los niveles de Fe de los organismos expuestos aumentaron significativamente con respecto a los niveles basales, sin que se registren cambios significativos a ambos tiempos de exposición ($p<0,05$).

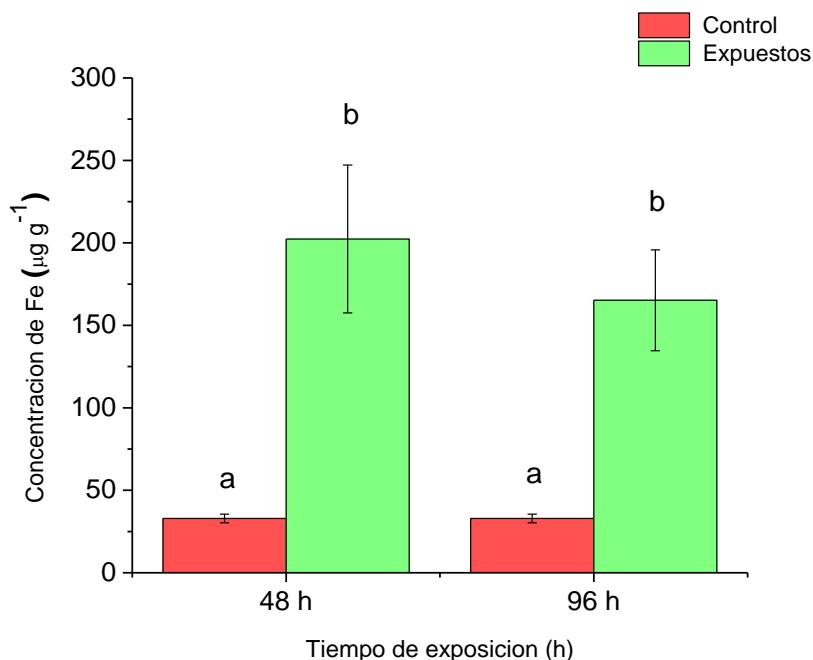


Fig. 61. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en el tejido blando total de *B. glabrata*, a diferentes tiempos de exposición, de organismos expuestos al medio acuoso, en ausencia de NPs de goethita (Control) y de organismos expuestos por 48 h o 96 h a una suspensión de NPs de goethita de concentración 10 mg L^{-1} .

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

Luego, se estudió la incorporación de NPs de goethita en presencia de verapamil (inhibidor de canales de Ca^{2+}) en el medio de exposición (Fig. 62). La concentración de Fe, de los organismos expuestos a NPs (10 mg L^{-1}) por 48 h y depurados por 24 h, fue significativamente mayor a la encontrada en los organismos controles ($p<0,05$). Además, los organismos expuestos por 48 h a una solución de $50 \mu\text{M}$ de verapamil, no presentaron diferencias significativas en la concentración de Fe con respecto a los niveles basales ($p>0,05$).

En cambio, los gasterópodos expuestos por 48 h a una suspensión de NPs (10 mg L^{-1}) y verapamil ($50 \mu\text{M}$), presentaron niveles de Fe similares a los controles, indicando que, los niveles de Fe en los organismos expuestos a NPs no aumentaron ($p<0,05$) por efecto del verapamil (Fig. 62).

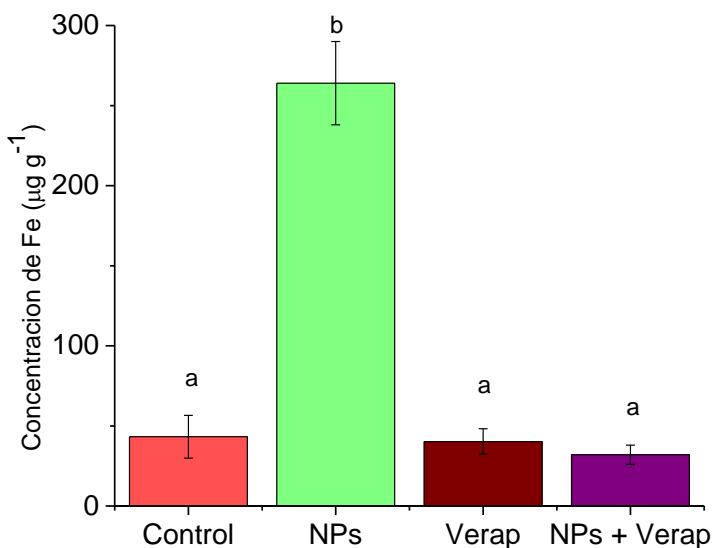


Fig. 62. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en el tejido blando total de *B. glabrata*. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs y de verapamil. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita. **Verap:** organismos expuestos a una solución de verapamil de $50 \mu\text{M}$. **NPs + Verap:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita + $50 \mu\text{M}$ de verapamil.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Además, se estudió la interacción del verapamil con una suspensión de NPs de goethita, en ausencia de organismos, por espectrofotometría UV-Visible. Se observó que el espectro de una solución de $50 \mu\text{M}$ de verapamil recién preparada ($t = 0 \text{ h}$) y de la misma solución luego de 48 h no se modificaba (Fig. 63A).

Anteriormente, en el capítulo de Resultados (ítem 1.1), se informó que una suspensión de NPs de goethita 10 mg L^{-1} presentó cambios en el espectro UV-Visible luego de 48 h de ser preparada (las NPs habían decantado). Al realizar el ensayo nuevamente se verificó el mismo resultado (Fig. 63B).

Del mismo modo, se observó que luego de 48 h , el espectro de la suspensión de la mezcla NPs + Verap se modificaba con respecto al de $t = 0 \text{ h}$. A las 48 h el espectro de la mezcla NPs + Verap, resultaba igual al de verapamil en ausencia de NPs (Fig. 63C).

Resultados

Estos resultados sugieren que, pasadas las 48 h, las NPs presentarían el mismo comportamiento de sedimentación tanto en presencia como en ausencia de verapamil y que el verapamil continua en solución. En consecuencia, no se verificaría ningún tipo de interacción importante entre ambos.

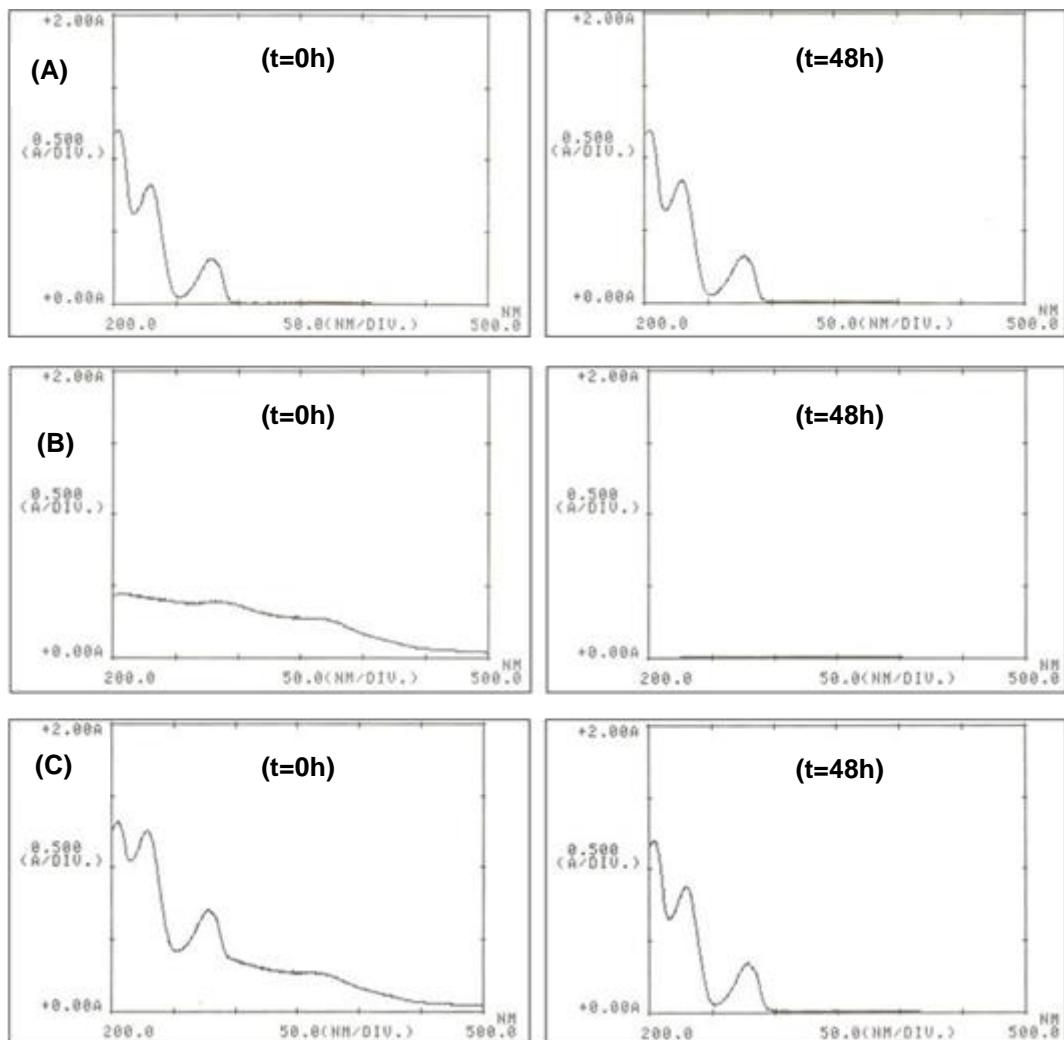


Fig. 63. Espectros UV-Visible (200 nm – 500 nm) realizados a tiempos $t = 0$ h y 48 h de ser preparadas las soluciones o suspensiones. **(A)** Solución de verapamil 50 μM . **(B)** Suspensión de NPs de goethita de 10 mg L^{-1} . **(C)** Suspensión de NPs de goethita de 10 mg L^{-1} contenido 50 μM de verapamil.

11.2. Efectos subcelulares en presencia de NPs de goethita

La actividad de SOD se determinó en organismos expuestos por 48 h a una suspensión de NPs de 10 mg L^{-1} y sin depurar (Fig. 64). Los resultados mostraron un aumento significativo del 89 % en los organismos expuestos con respecto a los controles ($p<0,05$).

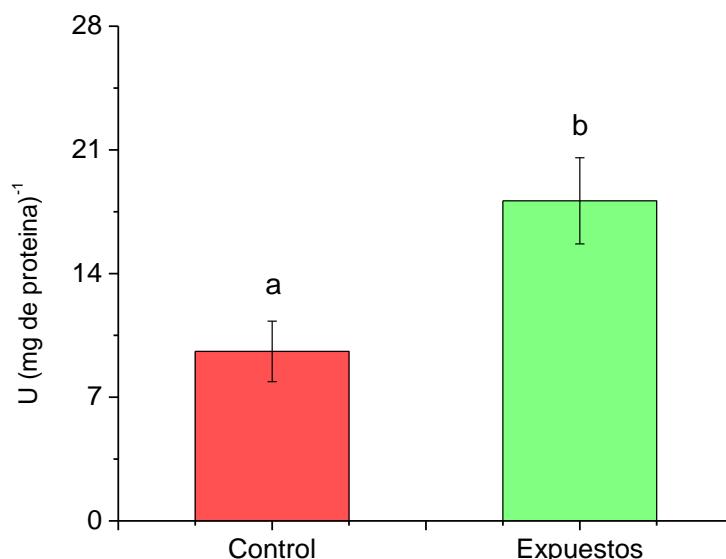


Fig. 64. Valor medio ($\pm \text{DE}$) de la actividad de la enzima SOD ($\text{U mg proteína}^{-1}$), en homogenatos de tejido blando total de *B. glabrata*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de goethita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L^{-1} .

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

La actividad de la enzima catalasa también se determinó en las mismas condiciones de ensayo (Fig. 65). En este caso, se observó un aumento significativo del 50 % ($p<0,05$).

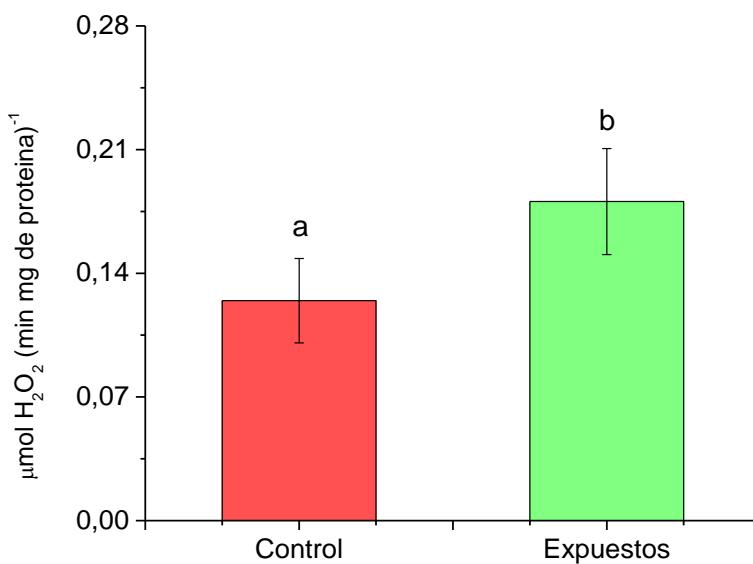


Fig. 65. Valor medio (\pm DE) de la actividad de la enzima CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 (\text{min mg proteína})^{-1}$), en homogenatos de tejido blando total de *B. glabrata*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de goethita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L^{-1} .

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Los niveles de glutatión totales se muestran en la Fig. 66. En este caso, no se observaron diferencias significativas entre los organismos expuestos a NPs y los controles ($p > 0,05$).

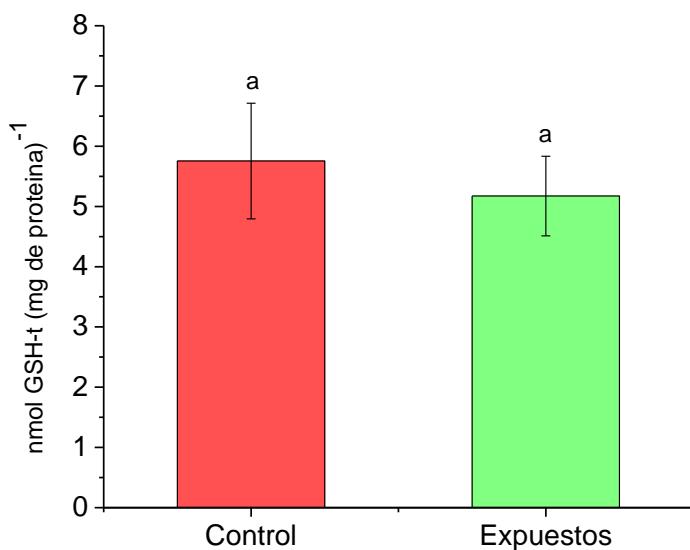


Fig. 66. Valor medio (\pm DE) de los niveles totales de glutatión (nmol GSH-t mg proteína $^{-1}$), en homogenatos de tejido blando total de *B. glabrata*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de goethita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L $^{-1}$.

Por otra parte, se determinó la capacidad antioxidante total frente a radicales peroxilos e hidroxilos. En primer lugar, se determinó, al igual que para *L. variegatus*, la cantidad de homogenato (en relación a proteínas) a utilizar. Para *B. glabrata* el valor resultó igual a 25 μ g de proteína, aproximadamente cuatro veces menor al utilizado frente a los oligoquetos.

En la Fig. 67A, se observa que el valor de TOSC porcentual frente a radicales peroxilos aumentó significativamente (un 67 %) con respecto a los controles ($p<0,05$), mientras que el valor de TOSC no se modificó frente a radicales hidroxilos ($p>0,05$) (Fig. 67B).

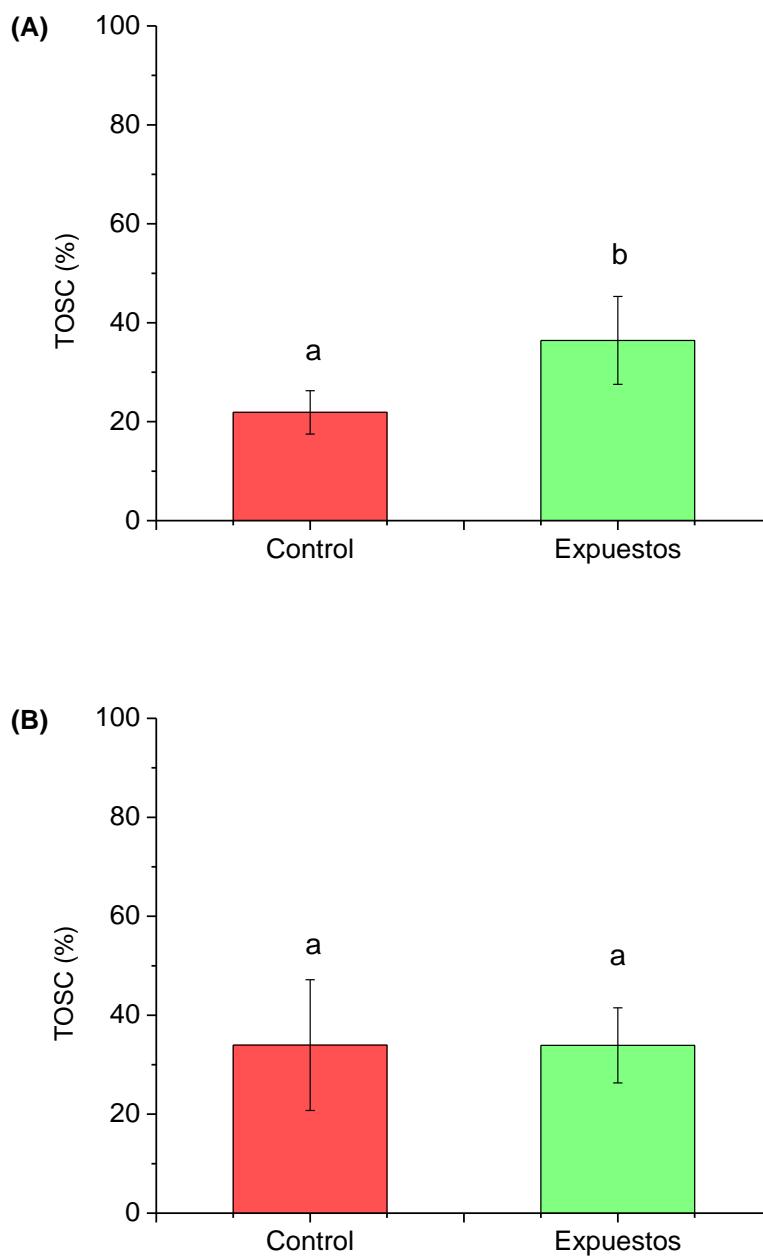


Fig. 67. Valor promedio (\pm DE) de TOSC % obtenido para organismos expuestos en ausencia (control) y en presencia de NPs de goethita (expuestos), durante 48 h. **(A)** TOSC % evaluada frente a radicales peroxilos. **(B)** TOSC % evaluada frente a radicales hidroxilos.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

Por otra parte, se estudió la peroxidación de lípidos mediante la determinación de TBARS (Fig. 68). En este caso, los valores obtenidos para los organismos expuestos a NPs no se modificaron con respecto a los de los controles ($p>0,05$).

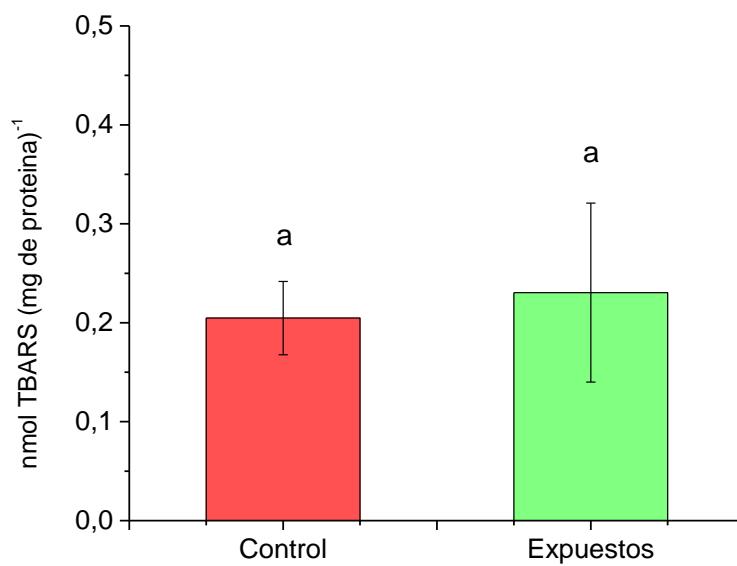


Fig. 68. Valor medio (\pm DE) de TBARS (nmol TBARS mg proteína $^{-1}$), en homogenatos de tejido blando total de *B. glabrata*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de goethita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L $^{-1}$.

Finalmente, se estudió la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Fig. 69). Los resultados obtenidos no evidenciaron cambios entre los organismos expuestos a NPs y los controles ($p>0,05$).

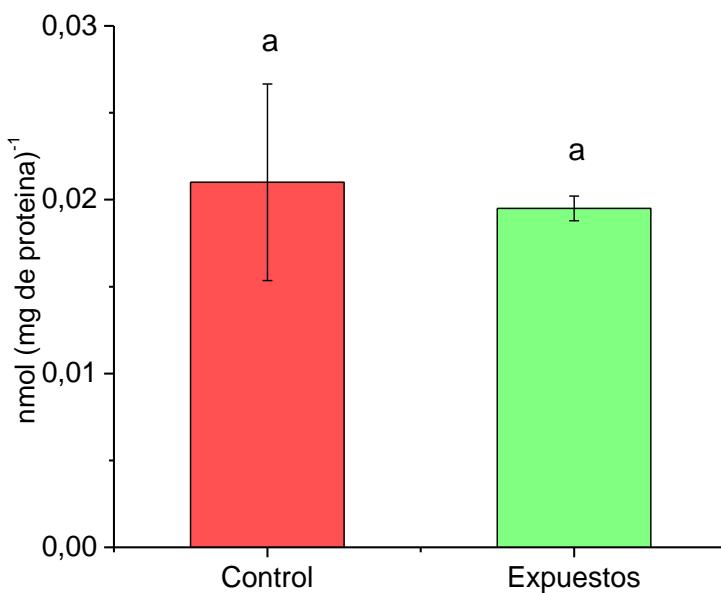


Fig. 69. Valor medio (\pm DE) de la actividad de AChE (nmol mg proteína⁻¹), en homogenatos de tejido blando total de *B. glabrata*, expuestos por 48 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs de goethita. **Expuestos:** organismos expuestos a una suspensión de NPs de goethita de 10 mg L⁻¹.

12. Interacción de NPs con otras sustancias presentes en el medio

12.1. Ácidos húmicos (AH)

La influencia de los AH en la incorporación de NPs de goethita fue estudiada en los oligoquetos, *L. variegatus*, y en los gasterópodos, *B. glabrata*. Los resultados se presentan en la Fig. 70A y B, respectivamente.

La solución de AH no tuvo influencia en los niveles de Fe presentes en los invertebrados comparando con sus respectivos valores basales ($p>0,05$) (Fig. 70A y B). En *L. variegatus* expuestos a la mezcla binaria NPs + AH, el contenido de Fe disminuyó respecto al valor encontrado en organismos expuestos a las NPs solamente ($p<0,05$), resultando similar al registrado en los niveles controles ($p>0,05$) (Fig. 70A). Los gasterópodos siguieron el mismo patrón (Fig. 70B).

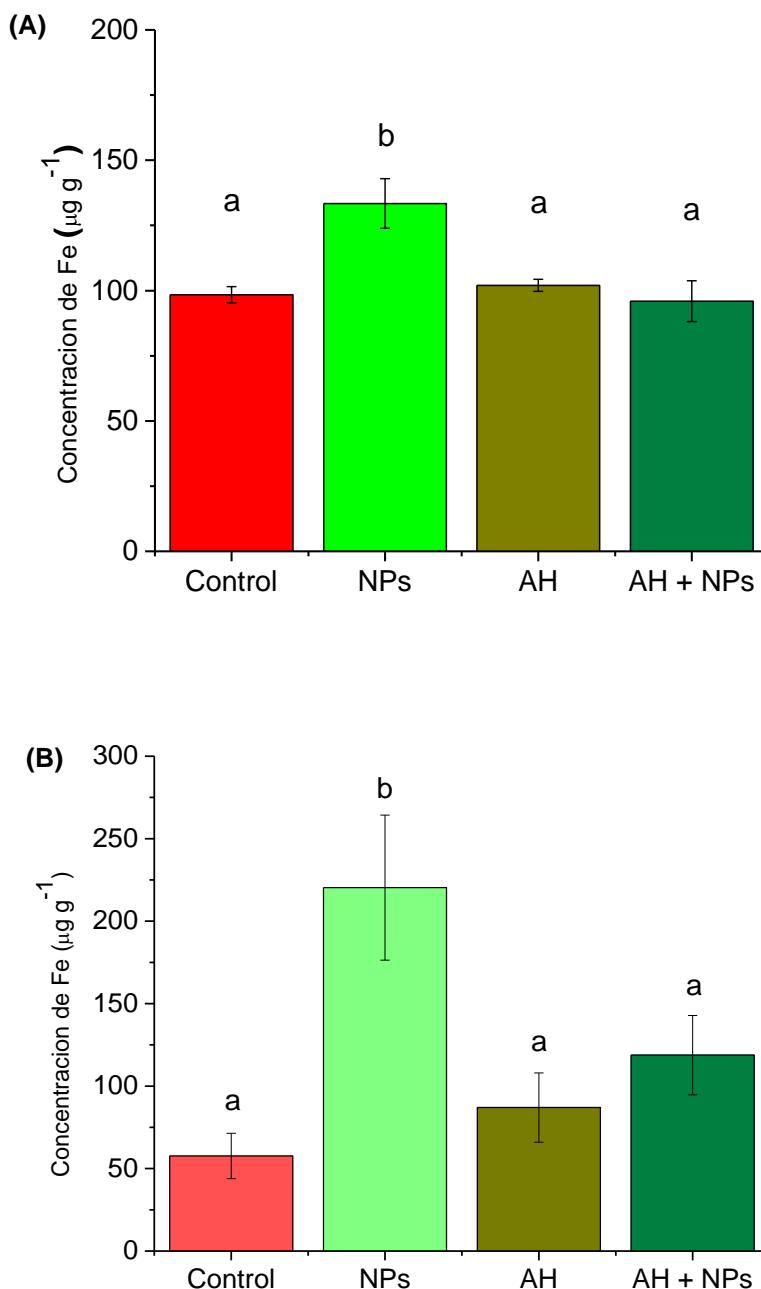
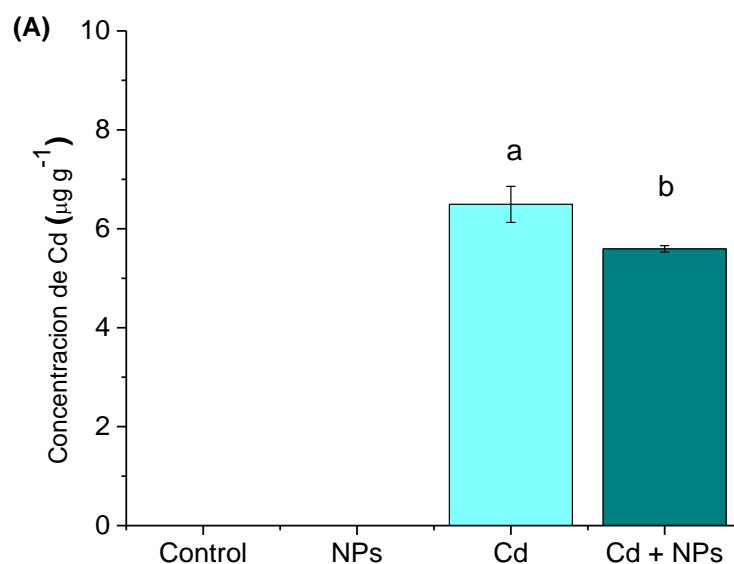


Fig. 70. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en (A) *L. variegatus*, (B) *B. glabrata*. Los organismos fueron expuestos por 48 h y luego depurados por 4 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs y de AH. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita. **AH:** organismos expuestos a una solución de 20 mg L^{-1} de AH. **AH + NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita + 20 mg L^{-1} de AH.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

12.2. Cadmio

El ingreso de Cd en *L. variegatus* en presencia y en ausencia de NPs de goethita o magnetita se muestra en la Fig. 71A y B. Los niveles de Cd en los organismos controles y en aquellos expuestos a una u otra NP (goethita o magnetita) se encontraron por debajo del límite de detección ($0,12 \mu\text{g Cd g}^{-1}$). En cambio, la concentración de Cd presente en los organismos expuestos a una solución de $0,1 \text{ mg Cd L}^{-1}$ demostró que estos organismos eran capaces de incorporar al metal. La presencia de NPs en el medio, provocó una ligera, pero estadísticamente significativa, disminución del Cd absorbido (14 %) por efecto de las NPs de goethita (Fig. 71A) y del 26 % por efecto de las NPs de magnetita (Fig. 71B) ($p<0,05$).



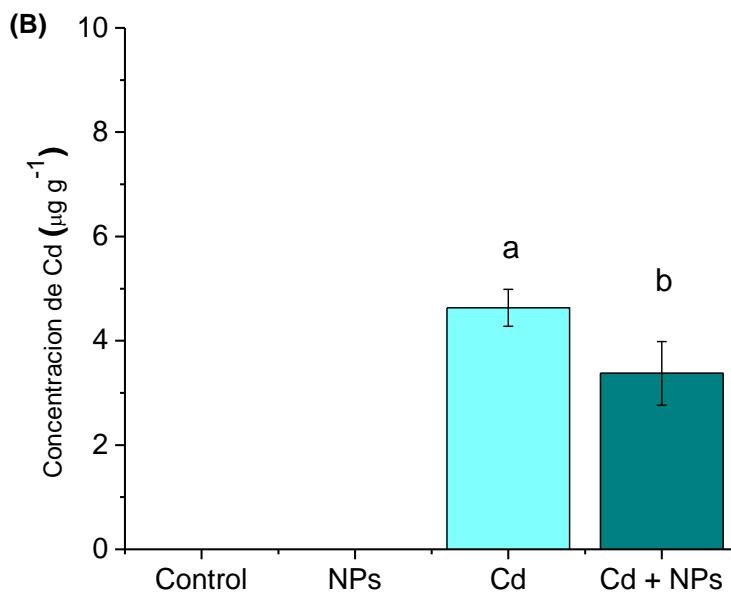


Fig. 71. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *L. variegatus* expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **(A)** Expuestos a NPs goethita. **(B)** Expuestos a NPs de magnetita. **Control:** organismos expuesto al medio acuoso en ausencia de NPs. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs. **Cd:** organismos expuestos a una solución de Cd de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. **Cd + NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

Los niveles de Fe también se determinaron en los organismos expuestos a NPs en presencia y ausencia de Cd (Fig. 72A y B). Para ambas NPs estudiadas no se observaron diferencias significativas de los niveles de Fe entre los controles y los oligoquetos expuestos a Cd ($p>0,05$). Por otro parte, los oligoquetos expuestos a NPs, luego de 4 h de depuración, mostraron niveles de Fe más altos que los controles ($p<0,05$). Los organismos expuestos a la mezcla de NPs + Cd presentaron niveles significativamente más altos con respecto a los expuestos sólo a NPs ($p<0,05$).

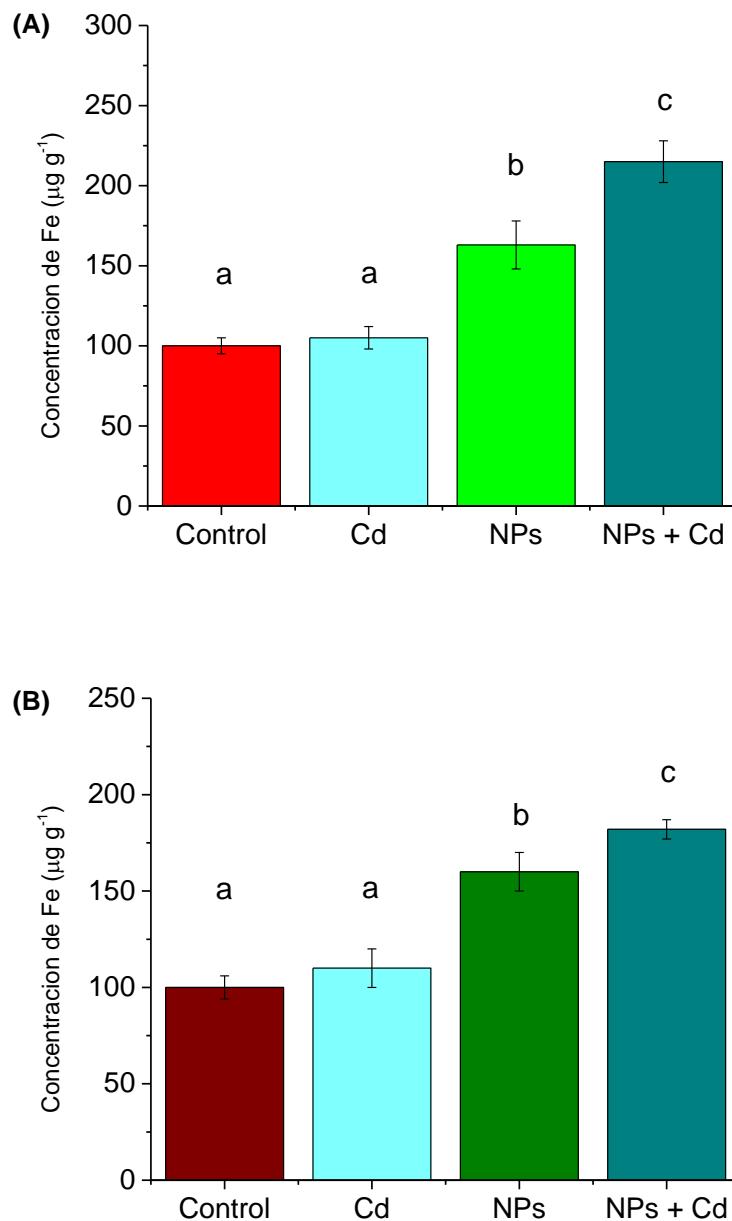


Fig. 72. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *L. variegatus* expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **(A)** Expuestos a NPs goethita. **(B)** Expuestos a NPs de magnetita. **Control:** organismos expuesto al medio acuoso en ausencia de NPs. **Cd:** organismos expuestos a una solución de Cd de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs. **NPs + Cd:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

La incorporación de Cd también se estudió en los organismos de la especie *B. glabrata*. Se estudió el ingreso de Cd en función de la concentración del metal.

Resultados

Los resultados demostraron que existe una relación logarítmica entre la cantidad absorbida y los niveles de exposición, la cual se describe mediante la ecuación mostrada en la Fig. 73.

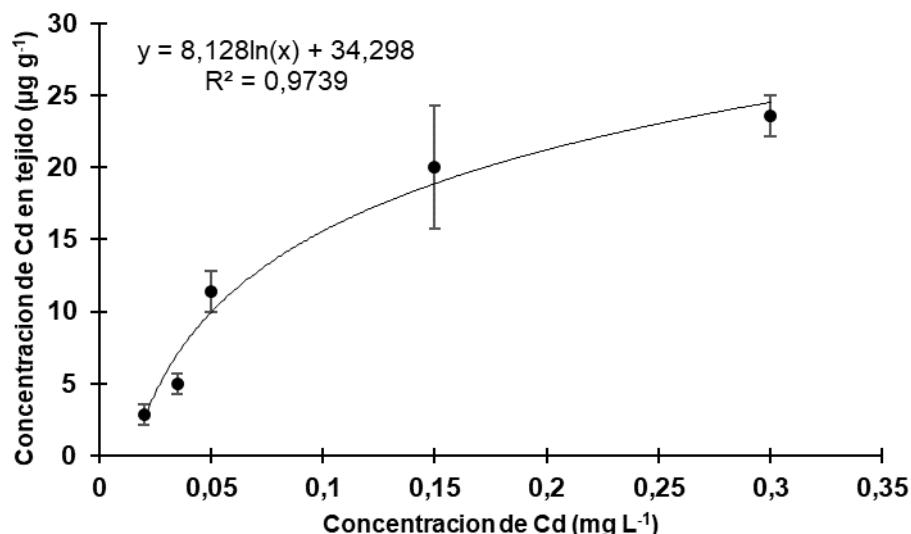


Fig. 73. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en el tejido blando total de *B. glabrata* en función de la concentración nominal de Cd, luego de exponer los organismos por 48 h y depurados por 6 h.

El efecto de la presencia de NPs de goethita en los niveles de Cd de *B. glabrata* se muestra en la Fig. 74. Al igual que lo observado en los oligoquetos los valores del metal en los organismos controles y en los expuestos solamente a las NPs, estaban por debajo del LD ($0,12 \mu\text{g Cd g}^{-1}$). En cambio, en presencia de la mezcla binaria (Cd + NPs) los niveles de Cd incorporados por los gasterópodos aumentaron significativamente un 42 % en presencia de NPs con respecto a los registrados en los organismos expuestos solamente a la solución del metal ($p<0,05$).

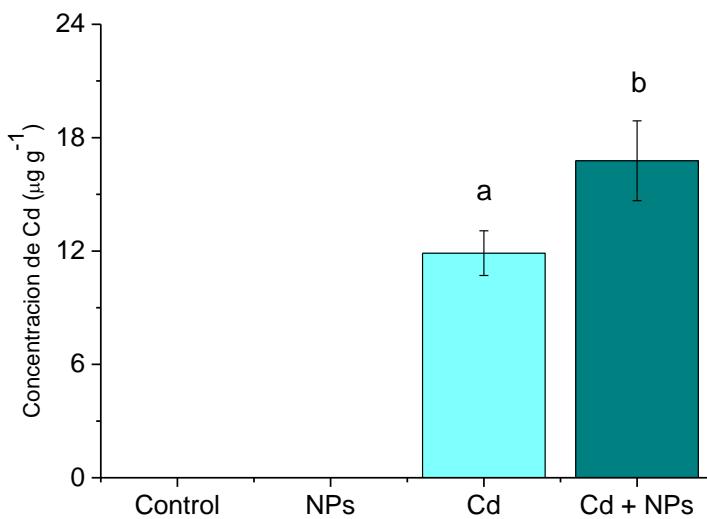


Fig. 74. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *B. glabrata* expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita. **Cd:** organismos expuestos a una solución de Cd de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. **Cd + NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

Los niveles de Fe en los organismos expuestos a NPs en presencia y ausencia de Cd se muestran en la Fig. 75. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de Fe de los controles y los expuestos a Cd ($p>0,05$). En cambio, los gasterópodos expuestos a NPs, luego de 4 h de depuración, mostraron niveles de Fe más altos que los controles ($p<0,05$). A su vez, los gasterópodos expuestos a la mezcla de NPs + Cd presentaron niveles significativamente más altos con respecto a los expuestos sólo a NPs ($p<0,05$).

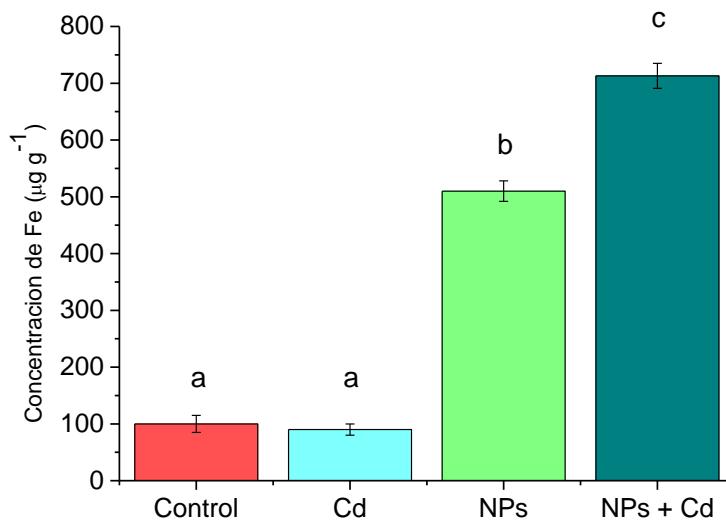


Fig. 75. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *B. glabrata*, expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **Control:** organismos expuestos al medio acuoso en ausencia de NPs. **Cd:** organismos expuestos a una solución de Cd de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita. **NPs + Cd:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

12.3. Plomo

La influencia de las NPs de goethita o magnetita en el ingreso de Pb en *L. variegatus* se presenta en la Fig. 76A y B, respectivamente. Los niveles de metal en los organismos controles y en aquellos expuestos solamente a NPs, se encontraban por debajo del límite de detección ($1,25 \mu\text{g Pb g}^{-1}$). Los organismos expuestos únicamente a la solución de Pb demostraron ser capaces de absorber dicho metal. Sin embargo, a diferencia de lo observado frente al Cd en estos organismos, las NPs de goethita o magnetita no produjeron ningún cambio en la incorporación de Pb.

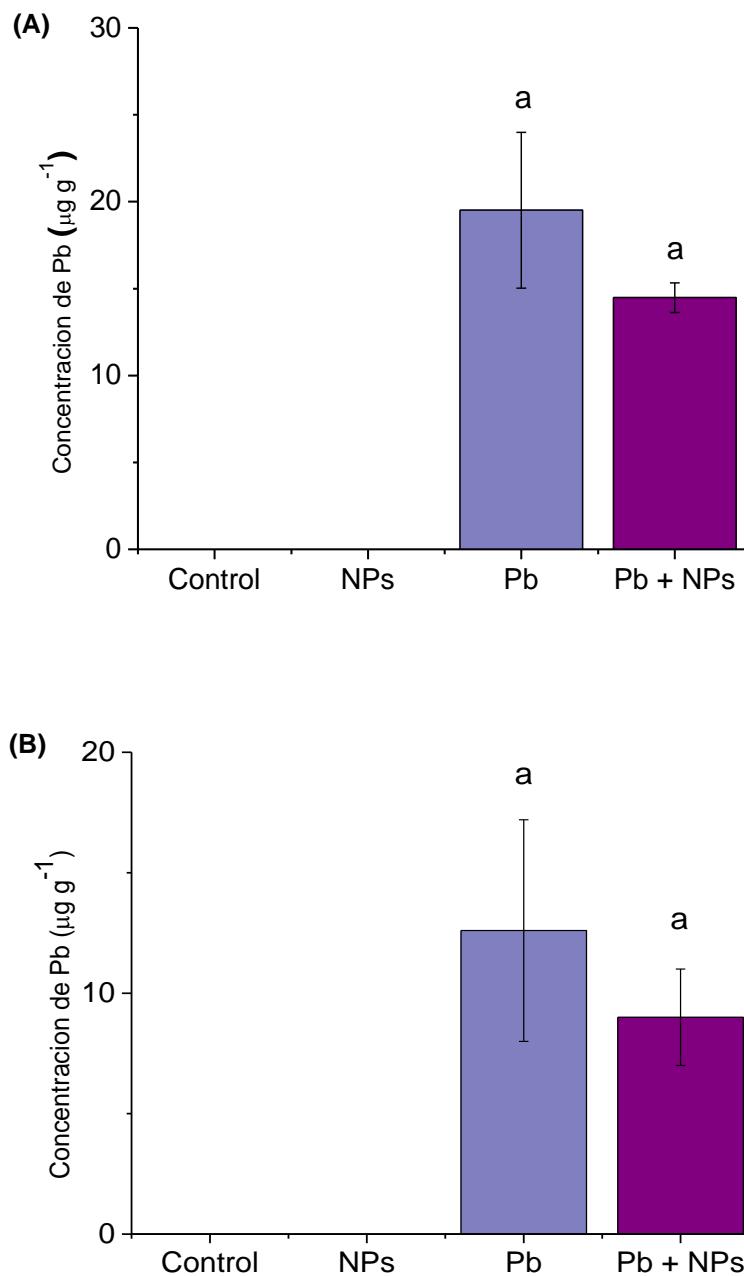


Fig. 76. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *L. variegatus*, expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **(A)** Expuestos a NPs goethita. **(B)** Expuestos a NPs de magnetita. **Control:** organismos expuesto al medio acuoso en ausencia de NPs. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs. **Pb:** organismos expuestos a una solución de Pb de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. **Pb + NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb.

En la Fig. 77A y B, se puede observar que los niveles de Fe no difieren entre los oligoquetos expuestos a Pb con respecto a los controles ($p>0,05$). Al igual que lo observado en las determinaciones con Cd, los niveles de Fe de los oligoquetos expuestos a NPs fueron significativamente mayores con respecto a los controles

($p<0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los oligoquetos expuestos a las NPs (goethita o magnetita, respectivamente), en presencia o ausencia de Pb ($p>0,05$).

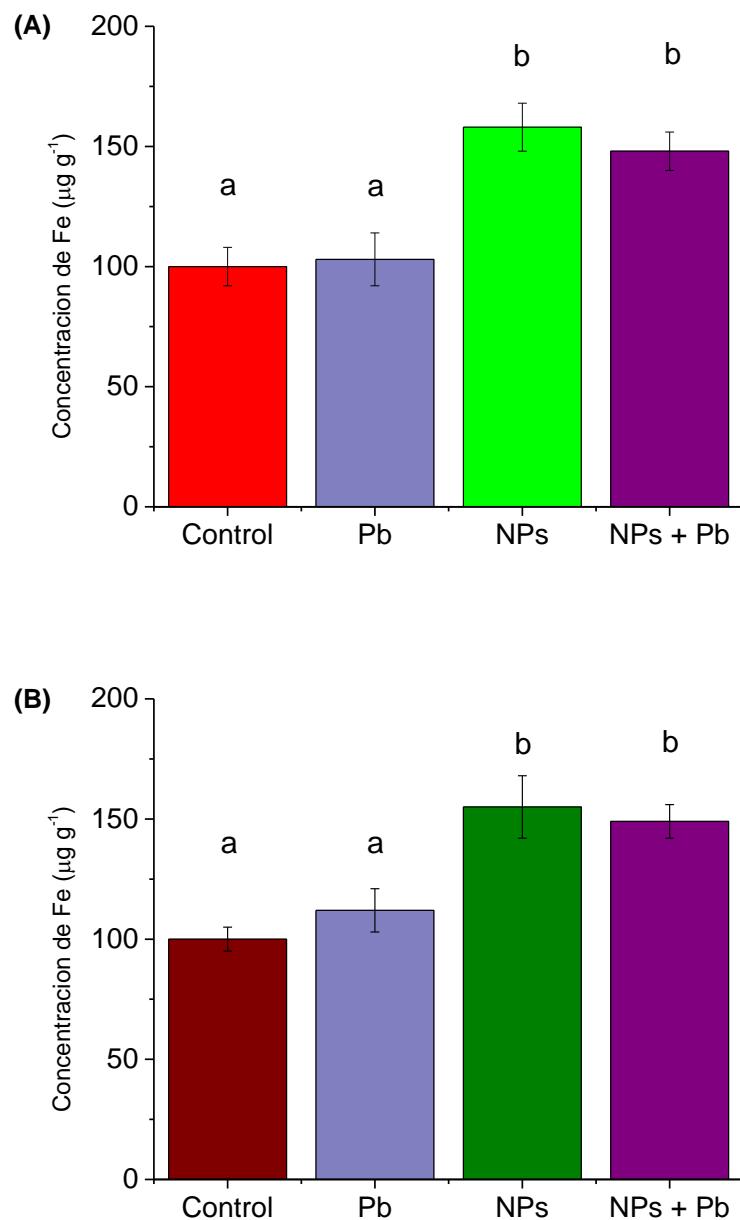


Fig. 77. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *L. variegatus* expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **(A)** Expuestos a NPs goethita. **(B)** Expuestos a NPs de magnetita. **Control:** organismos expuesto al medio acuoso en ausencia de NPs. **Pb:** organismos expuestos a una solución de Pb de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs. **NPs + Pb:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0,05$.

Resultados

Los mismos estudios, se realizaron para la especie *B. glabrata*, pero solamente con NPs de goethita (Fig. 78). Tanto los organismos controles como los expuestos a las NPs, presentaron valores de Pb por debajo del límite de detección ($1,25 \mu\text{g Pb g}^{-1}$). Los organismos expuestos a soluciones de Pb, evidenciaron el ingreso del metal en *B. glabrata*, sin que se registraran diferencias significativas con aquellos expuestos a la mezcla binaria de Pb + NPs ($p>0,05$).

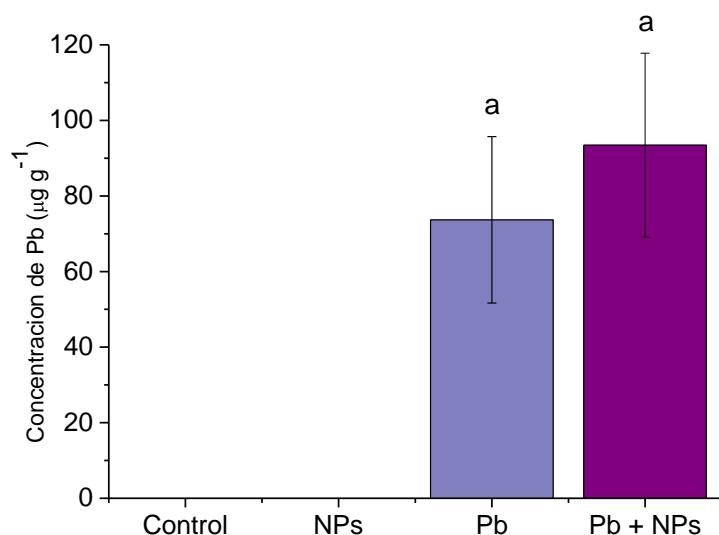


Fig. 78. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *B. glabrata* expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **Control:** organismos expuesto al medio acuoso en ausencia de NPs. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita. **Pb:** organismos expuestos a una solución de Pb de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. **Pb + NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb.

Tampoco se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) en los niveles de Fe hallados en organismos expuestos a NPs, en presencia o ausencia de Pb (Fig. 79).

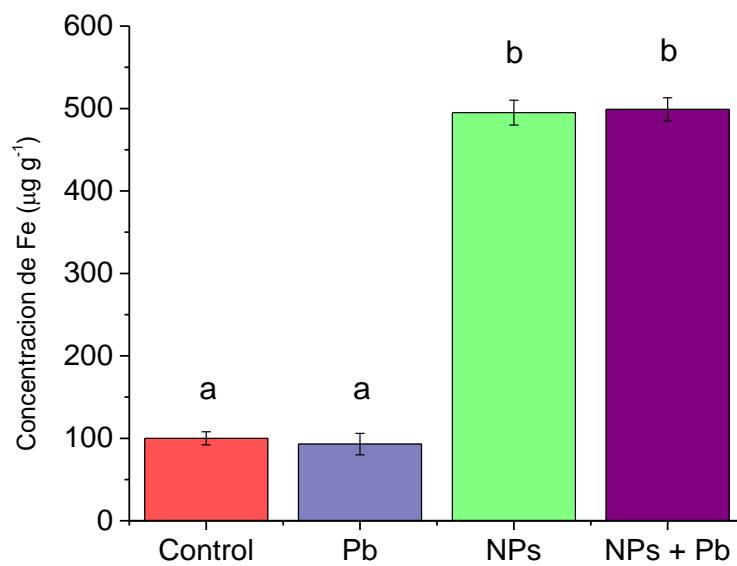


Fig. 79. Valor promedio (\pm DE) de la concentración de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en *B. glabrata*, expuestos por 48 h y depurados por 4 h. **Control:** organismos expuesto al medio acuoso en ausencia de NPs. **Pb:** organismos expuestos a una solución de Pb de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. **NPs:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita. **NPs + Pb:** organismos expuestos a una suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb.

Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Discusión

Antes de evaluar los efectos tóxicos de las NPs, la mayoría de los autores, así como diversas agencias internacionales, recomiendan caracterizar al material de partida y su comportamiento en el medio de exposición (German environment agency 2016, Handy y col. 2012, Crane y col. 2008). También sugieren caracterizar a las NPs, antes, durante y al término de los ensayos toxicológicos, con el fin de disponer de mayor información acerca del estado de agregación del nanomaterial, el cual condiciona las posibles vías de ingreso en los organismos (Fadeel y col. 2015, Handy y col. 2012).

Para este trabajo se emplearon distintas técnicas para determinar algunas de las principales propiedades físico-químicas de las suspensiones comerciales de las NPs de óxidos de Fe seleccionadas.

El TEM permitió establecer la morfología y el tamaño de las NPs. En las suspensiones analizadas, se pudo observar que presentaban una morfología homogénea, así como una baja dispersión en el tamaño de las partículas. Los patrones de difracción de electrones obtenidos evidenciaron la estructura cristalina de las NPs de goethita y magnetita en las suspensiones y mediante EDAX se confirmó la presencia de los elementos Fe y O, como principales constituyentes de las mismas.

Además, el tamaño de las NPs de goethita se midió en una suspensión de 2.500 mg L⁻¹ en agua milli-Q, previamente filtrada por membrana de 0,22 µm, empleando DLS. Los resultados fueron similares a los hallados por TEM (Tabla 7). Por consiguiente, aun cuando esas técnicas se basan en diferentes principios de medición, permitieron ratificar el tamaño de partícula medido. El tamaño de partículas de la suspensión comercial de magnetita no pudo verificarse por DLS, ya que esta técnica recurre a la acción de un campo electromagnético. De esta manera, en virtud de las características magnéticas de estas NPs, podrían exhibir un comportamiento atípico en el sistema de medición, conduciendo a errores en la determinación.

| | Técnica | Tamaño de partículas (nm) |
|---|------------------|---------------------------|
| Suspensión comercial de NPs de goethita, datos del proveedor | Análisis por DLS | ≤ 110 |
| Suspensión comercial de NPs de goethita (obtenido experimentalmente) | Análisis por TEM | 108 ± 5 |
| Suspensión de 2500 mg L^{-1} de NPs de goethita en agua milli-Q (filtrada) (obtenido experimentalmente) | Análisis por DLS | 79 ± 16 |

Tabla 7. Tamaño de partículas obtenidas por TEM y DLS de la suspensión comercial de goethita.

Las técnicas empleadas permitieron identificar y caracterizar al material de partida, y verificar que la caracterización obtenida concuerda aceptablemente con las especificadas por el proveedor. Simultáneamente, permitieron comprobar la alta pureza y homogeneidad de las NPs adquiridas comercialmente.

Además de las suspensiones comerciales, se caracterizaron el medio de exposición (agua de red declorada) y la suspensión de 10 mg L^{-1} de NPs de goethita preparada en el medio de exposición, tanto en ausencia como en presencia de ácidos húmicos (AH).

El medio de exposición se caracterizó por DLS, potencial Z y espectroscopía UV-Visible. El resultado obtenido por DLS reveló la presencia de material particulado o coloidal con una distribución del tamaño de partículas heterogénea y con un promedio de tamaño mucho mayor al de las NPs de goethita. La presencia de material espurio en el medio de exposición, también se verificó por la medición del potencial Z ya que el valor de éste fue distinto de cero. Hay que aclarar que un valor de cero indicaría que no existe material particulado o coloidal en el medio. Además, el valor obtenido de potencial Z mostró que el medio de exposición era inestable. Por otra parte, el espectro de absorción UV-Visible, en el rango comprendido entre 200 y 500 nm, no presentó ningún pico de absorción.

La suspensión de trabajo de NPs de goethita en ausencia de ácidos húmicos se caracterizó por TEM, DLS, potencial Z y espectroscopia UV-Visible. Los

resultados obtenidos por TEM permitieron verificar que tanto la morfología, estructura, tamaño de partícula y composición no se modificaban con respecto a los parámetros determinados en la suspensión comercial.

El tamaño de partículas también fue determinado, comprobando que no presentaba cambios significativos por DLS luego de filtrar la suspensión por membrana de 0,22 µm. El tratamiento previo fue imprescindible para poder observar el tamaño de las NPs ya que, al medir la suspensión sin filtrar no se podía observar la distribución de tamaños de las NPs. Una posible causa de esto, es que el material particulado de mayor tamaño presente en el medio de exposición haya dispersado una mayor cantidad de luz, obstruyendo la señal dada por las NPs (Handy y col. 2012, NMIA 2012).

Un problema similar debió ocurrir con el resultado obtenido de potencial Z, ya que el valor del mismo no difirió significativamente con el valor registrado para el medio de exposición. Por lo tanto, el comportamiento y la estabilidad de las NPs en el medio no pueden ser determinados por esta técnica.

Si bien varios autores han empleado el potencial Z para caracterizar la estabilidad de las NPs antes de evaluar efectos tóxicos en especies acuáticas, su empleo se ve limitado por la complejidad del sistema (Oliveira-Filho y col. 2016, García y col. 2011). El potencial Z indica la estabilidad de las partículas y su valor depende de ciertas características del medio como, por ejemplo, pH y fuerza iónica, y se realiza para caracterizar la estabilidad de NPs manufacturadas en ausencia de sustancias químicas, y de cualquier otro tipo de material particulado, permitiendo sólo así, estudiar el comportamiento de las NPs. Por esto, el empleo de esta técnica en sistemas más complejos, con presencia simultánea de otras sustancias, presentaría algunas restricciones, ya que, el valor determinado de potencial Z sería el resultante del sistema heterogéneo y no podría ser adjudicado solamente a las NPs.

Por lo tanto, la inestabilidad de las NPs en el medio de exposición se verificó por las características ópticas observadas mediante los espectros de absorción en la región UV-Visible, en el rango de longitudes de onda entre 200 y 500 nm, de la suspensión recién preparada ($t = 0$ h) y a un tiempo $t = 48$ h posterior a su

preparación (tiempo de exposición de los bioensayos). El espectro de absorción a $t = 0$ h presentó un pico de absorción máximo a 290 nm, el cual estaba ausente en el espectro obtenido para el medio de exposición (agua declorada). Luego de 48 h, el espectro resultante para la misma suspensión no presentó picos y puso en evidencia que al cabo de dicho lapso, las NPs experimentan un proceso de sedimentación. Dicho proceso también se pudo comprobar visualmente, al observar material particulado decantado en la parte inferior de los viales.

Este último resultado se modificó por la presencia simultánea de AH (20 mg L^{-1}) en el medio de exposición. Los espectros de absorción a $t = 0$ h y a $t = 48$ h de la suspensión de NPs en presencia de AH no se alteraron. Este resultado indicaría que los ácidos húmicos actuarían estabilizando a la suspensión de NPs, impidiendo su sedimentación durante el tiempo estudiado.

Debido a su alta reactividad, las NPs pueden formar aglomerados o agregados, adquiriendo un mayor tamaño que las partículas originales y por esta razón pueden decantar durante el período de exposición. Estos cambios en la forma y tamaño de las NPs pueden complicar la interpretación de los bioensayos. Diversos autores han demostrado que frente a diversas NPs, las sustancias húmicas, ya sean de origen natural o comercial, previenen los procesos de aglomeración y/o agregación (Loosli y col. 2013, Hu y col. 2010, Handy y col. 2008). Aparentemente, la materia orgánica modificaría las características de la superficie de las NPs, mediante la formación de recubrimientos superficiales que aumentarían la estabilidad de las suspensiones acuosas (Gao y col. 2012). Este hecho podría modificar la biodisponibilidad de las NPs en el medio y la incorporación de las mismas por las especies acuáticas. Por ejemplo, se ha comprobado que cuando las NPs de plata estaban recubiertas por AH, presentaban una menor tendencia a agregarse que cuando estaban recubiertas con citrato, hecho que favorecería su ingreso en el caracol dulceacuícola *Lymnaea stagnalis*, a partir de la fase acuosa (Croteau y col. 2011).

Por otra parte, la medición de los espectros de absorción ha demostrado ser una herramienta útil, rápida, complementaria y presente en la mayoría de los laboratorios, a la hora de evaluar el comportamiento de las NPs en el medio de

exposición, incluso en presencia de material espurio en el medio o de ácidos húmicos. Si bien esta técnica pudo ser utilizada teniendo en cuenta las características ópticas de las NPs en cuestión, su empleo dependerá de las NPs y de la complejidad del sistema.

Por otro lado, los resultados pusieron en evidencia la complejidad y las dificultades que pueden presentarse al intentar caracterizar las NPs en el medio de exposición. Hasta el momento, no se cuenta con normativas para caracterizar a las NPs en el medio de exposición. En consecuencia, se deben utilizar diversas técnicas para evitar errores de interpretación. Estas limitaciones ya han sido reportadas por diversos autores (Rajala 2017, Handy y col. 2012, Lead and Smith 2009).

Como se mencionó anteriormente, las NPs idealmente deberían caracterizarse no sólo antes, sino también durante el desarrollo y al finalizar los ensayos toxicológicos (Fadeel y col. 2015, Handy y col. 2012). De esta manera se dispondría de mayor información para interpretar los efectos observados. Sin embargo, la complejidad del sistema (presencia de material particulado, organismos, secreciones biológicas, sustancias orgánicas e inorgánicas) y las metodologías disponibles aún limitan alcanzar este ideal. Además, no todos los instrumentos de medición necesarios para llevar adelante una adecuada caracterización, se encuentran disponibles en los laboratorios de estudios toxicológicos ni son de fácil adquisición (TEM, EDAX, DLS, Potencial Z, entre otros).

Otro punto a esclarecer eran la determinación de la concentración experimental de NPs a la hora de realizar el bioensayo y cómo evaluar su posible incorporación en los organismos biológicos. Para esto, suspensiones de NPs de goethita y magnetita (10 mg L^{-1}) en presencia y ausencia de tejido biológico fueron digeridas durante 8 h con ácido nítrico concentrado y luego el Fe, como elemento indicador, fue determinado en las soluciones resultantes por técnicas de AAS. Los resultados obtenidos experimentalmente no mostraron diferencias significativas en ningún caso, con respecto a los valores nominales, por lo tanto, se comprobó que el nivel de exposición utilizado en los bioensayos para ambas

NPs de Fe era aproximadamente igual a 10 mg L^{-1} y que, además esta metodología podía utilizarse para estudiar la incorporación de NPs en organismos acuáticos.

Si bien, todavía se sigue discutiendo la forma de expresión de las concentraciones, así como los métodos más adecuados para determinar los niveles de exposición, y la manera de evaluar la incorporación de NPs en los organismos, la aproximación de cuantificar al metal resultó de gran utilidad para los propósitos planteados (Handy y col. 2012). De hecho, en los casos de NPs metálicas y sus óxidos, los análisis de metales constituyen la mejor aproximación para investigar su ingreso y acumulación en los organismos y han sido ampliamente utilizados por diversos autores. Por ejemplo, Hu y col. (2012) estudiaron la incorporación de NPs de óxidos de Fe magnéticas en *Ceriodaphnia dubia*, midiendo los niveles de Fe en los organismos por absorción atómica, luego de realizar una digestión con HNO_3 . También Khan y col. (2015b) utilizaron la digestión con HNO_3 para luego medir los niveles de plata en tejidos de *L. variegatus* por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

Si bien esta aproximación puede ser utilizada con resultados satisfactorios frente a diversas NPs, su empleo debe ser verificado para cada NP en particular. Por ejemplo, las NPs de hidroxiapatita no pudieron ser digeridas mediante el empleo de ácidos minerales concentrados (HNO_3 solo o en mezclas de proporciones variables con HCl), pese a que la hidroxiapatita no-nano se pudo digerir con una mezcla $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ (Molena y col. 2015).

Para los bioensayos, se trabajó a una concentración de NPs igual a 10 mg L^{-1} . La misma fue seleccionada en base a los efectos observados frente a NPs de goethita en ensayos previos, luego de exponer durante 48 h a los organismos de la especie *L. variegatus* a concentraciones comprendidas entre 1 y 100 mg L^{-1} . Los resultados mostraron que a concentraciones mayores a 10 mg L^{-1} , los organismos presentaban evidentes signos de irritación, liberación de mucosidad al medio y comportamientos anómalos, respecto a los observados en los organismos controles.

Según la literatura, no se encontraron reportes acerca de niveles de NPs de óxidos de Fe que pueden estar presentes en la naturaleza (Liu y col. 2014). Sin embargo, mediante estudios de modelado se considera que los valores podrían encontrarse en el rango de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} (Liu y col. 2014).

La exposición a NPs de goethita por 48 h y posterior proceso de depuración por 4 h mostró un aumento de los niveles de Fe cuando se analizaron los tejidos blandos de ambos invertebrados. El aumento encontrado en los gasterópodos *B. glabrata* fue aproximadamente 8,5 veces mayor, que el observado en los oligoquetos *L. variegatus*. Curiosamente, los niveles basales de Fe en *L. variegatus* fueron mayores que los presentes en los gasterópodos. En ambos organismos, el grupo hemo estaría presente como pigmento respiratorio puesto que se ha demostrado una inhibición de la enzima δ -aminolevúlico-dehidrasa por exposición a plomo (Aisemberg y col. 2005). En consecuencia, el Fe sería un elemento esencial para estas especies. No obstante, todavía se desconocen muchos aspectos básicos relacionados con los procesos bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar en las numerosas especies de invertebrados, incluyendo aquellas que, como los oligoquetos, son reconocidos organismos bioindicadores de contaminación.

El estudio de eliminación puso en evidencia otras interesantes diferencias en las respuestas de estos organismos frente a las NPs de goethita. Cuando los oligoquetos fueron depurados por un período de 16 h, los niveles de Fe retornaron a los valores basales. Usualmente, se considera que para estos organismos un período de depuración de 6 h sería suficiente para eliminar partículas de sedimentos naturales de su tracto digestivo (Dawson y col. 2003, Mount y col. 1999). De acuerdo a nuestros resultados, el tiempo fue mayor frente a NPs de goethita. En forma similar, Petersen y col. (2008) también reportaron un período mayor, de 72 h, para la eliminación de nanotubos de carbono en estos organismos (Petersen y col. 2008).

En cambio, cuando los gasterópodos expuestos se dejaron depurar por hasta 24 h, no hubo cambios significativos en el contenido de Fe. Para investigar mejor el proceso, se procedió a analizar los niveles de Fe en las distintas regiones

anatómicas de *B. glabrata*. En la región céfalopedal de organismos expuestos los valores fueron similares a los observados en organismos controles a todos los tiempos de depuración. En cambio, en la hemolinfa se encontraron valores máximos cuando provenía de organismos depurados por 4 h, los cuales retornaron a los niveles basales tras 24 h de depuración. En el resto de los tejidos (región pulmonar, digestiva y gónadas) el contenido de Fe fue considerablemente mayor respecto a los controles, sin que se observaran diferencias significativas por efecto del período de depuración.

En general, en organismos acuáticos se pueden distinguir tres posibles vías de ingreso: por adsorción superficial sobre los epitelios; mediante la ingesta de material particulado a través del tracto gastrointestinal, y por medio del sistema respiratorio.

En el caso de los organismos que habitan el bentos, como los oligoquetos, las tres posibles vías de ingreso se encuentran disponibles. Sin embargo, se considera que, por tratarse de organismos detritívoros, la ingestión de material particulado constituye la principal vía de ingreso para la incorporación de sustancias químicas contaminantes asociadas a las partículas. Por esta razón, esta especie ha sido seleccionada como organismo bioindicador para la evaluación de la toxicidad de muestras de aguas y sedimentos por las más importantes agencias ambientales (ASTM 2010, OECD 2007, US EPA 2000). También se ha propuesto su uso como modelo experimental para investigar los efectos adversos de nanomateriales (ECHA 2017).

Por otra parte, mediante el así llamado Modelo Biodinámico, se ha demostrado que no existe una única ruta de ingreso para la bioacumulación de elementos metálicos en *L. variegatus* (Camusso y col. 2012). El níquel ingresaría fundamentalmente a través del agua de poro (Camusso y col. 2012). En cambio, metales como el arsénico, cadmio, cobre y zinc se incorporarían principalmente mediante la ingestión de partículas de sedimentos, mientras que para el plomo ambas vías de ingreso contribuirían en proporciones comparables (Camusso y col. 2012). En dicho reporte no se utilizaron nanomateriales como tampoco se

estudió la incorporación de Fe, sin embargo, ese trabajo permite comprender la relevancia de las distintas vías en el ingreso de metales en estos oligoquetos.

No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que tanto las NPs de goethita como las de magnetita únicamente podrían ser incorporadas transitoriamente en el tracto gastrointestinal de los oligoquetos, pero sin que se verifique un proceso de absorción, ya que, tras un relativamente corto período de depuración, los niveles de Fe en los organismos retornaron a los valores basales. Otra posibilidad, es que el mayor aumento en los niveles de Fe presente en oligoquetos depurados por períodos menores a 16 h, sea una simple consecuencia de un proceso de adsorción superficial.

El tiempo de exposición no tendría un efecto significativo en el ingreso de estas NPs. Tras una exposición de 96 h a NPs de goethita o de magnetita seguida de 24 h de depuración, las concentraciones de Fe resultaron similares a los niveles basales.

Por lo tanto, no es de esperar que los organismos acumulen las NPs de óxidos de Fe estudiadas. Resultados similares, fueron reportados para estos organismos, luego de exposiciones crónicas a nanotubos de carbono (Petersen y col. 2008) o a NPs de óxidos de aluminio (Stanley y col. 2010).

En el caso particular de los gasterópodos de la especie *B. glabrata*, por tratarse de organismos pulmonados que salen a la superficie para respirar, quedan disponibles únicamente dos vías de ingreso: por adsorción sobre los epitelios y mediante el tracto gastrointestinal. La región céfalo-pedal es la más expuesta al medio, de manera que al encontrarse siempre los mismos niveles de Fe que en los controles, se podría considerar que el proceso de adsorción superficial sería despreciable. Por otra parte, las variaciones temporales de Fe en la hemolinfa sugieren que las NPs pudieron ser efectivamente absorbidas y distribuidas rápidamente al resto de los tejidos. Dado que su eliminación requeriría de tiempos mayores a 24 h, existe la posibilidad de que estos gasterópodos puedan llegar a bioacumular a las NPs de goethita.

Si bien es cierto que los análisis de metales (Fe en este caso) constituyen una aproximación ampliamente aceptada para evaluar el ingreso de NPs de metales y óxidos metálicos, no debe descartarse que dichas NPs podrían estar disolviéndose, al menos parcialmente, en el medio durante el tiempo de exposición o incluso dentro de los organismos. De ser así, los efectos adversos resultantes serían inducidos por las especies iónicas libres y no por la presencia de NPs como tales. Bajo ciertas condiciones, las NPs de plata se disuelven liberando iones Ag (I), los cuales son los principales causantes de los efectos observados en organismos acuáticos (Je Jo y col. 2012).

Sin embargo, los oxohidróxidos de Fe son estables en la naturaleza, siendo la goethita de los más estables a escala nanométrica (Raiswell 2011). Es común encontrarla en ambientes acuáticos con pH ácido o básico (Dove y col. 2013). Entre pH 6 y 9, la goethita presenta el mínimo de solubilidad, aumentando a valores de pH extremos (Cornell y Schwertmann 2003). Si bien, Cornell y Schwertmann (2003) muestran que las partículas a escala nanométrica de goethita entre 10 - 1.000 nm pueden ver aumentada en dos órdenes la solubilidad, y hasta diez veces cuando su tamaño varía entre 1 - 10 nm, comparado con las mismas partículas a escala no nano, la solubilidad de las mismas sigue siendo muy baja, ya que la constante del producto de solubilidad se encuentra aproximadamente en un rango de $10^{-41} - 10^{-35}$ para partículas entre 2 y 12 nm perteneciendo éstas al rango de mayor aumento de solubilidad (Hiemstra 2015).

Además, según los datos declarados por el proveedor, las NPs de goethita empleadas en este trabajo son insolubles en agua. Así, se podría pensar que durante el tiempo de exposición la solubilidad de las NPs de goethita en el medio de exposición, no es significativa. Por lo tanto, es más probable que los aumentos de Fe puedan ser atribuidos a la incorporación de las NPs antes que a la disolución de especies iónicas libres.

Por otra parte, Romih y col. (2015) determinaron el potencial de acumulación de Fe y Co en isópodos expuestos en forma crónica a NPs de CoFeO₄ recubiertas con ácido cítrico. Los resultados demostraron que la bioacumulación no

dependía solamente de la fracción de iones metálicos disueltos a partir de las suspensiones, sino también de la capacidad fisiológica de los organismos para incorporar ambos metales, principalmente en relación a sus requerimientos nutricionales y a los mecanismos de homeostasis involucrados (Romih y col. 2015).

En consecuencia, las diferencias observadas entre los oligoquetos y los gasterópodos frente a las NPs de goethita podrían atribuirse a una adaptación diferencial de estas especies. Debido a que los oligoquetos son detritívoros y obtienen sus nutrientes básicamente mediante la ingesta de material particulado, quizás hayan desarrollado mecanismos efectivos para eliminar aquellas partículas con escaso o nulo valor nutritivo como serían estas NPs. No obstante, la explicación podría ser aún más compleja ya que en los oligoquetos terrestres de la especie *Eisenia fetida* (clásica lombriz terrestre) se encontró que tras una exposición de 72 h mediante papeles de filtro impregnados con una suspensión de las mismas NPs, o bien en suelo artificial por 10 días, los niveles de Fe presentes en los organismos resultaron menores a los valores basales (Cáceres Wenzel y col. 2016).

Teniendo en cuenta que *B. glabrata* era capaz de incorporar a las NPs de goethita, el siguiente paso fue intentar elucidar qué factores podrían influir en su ingreso. Según la literatura, se postula que el principal mecanismo de ingreso de las NPs en las células se verificaría mediante procesos de endocitosis (Beddoes y col. 2015). Por ejemplo, Khan y col. (2015a) reportaron que la endocitosis mediada por clatrina y caveolina eran los mecanismos más importantes de ingreso a las células en la especie *Peringia ulvae* (gasterópodo de estuario), luego de exponer los organismos a NPs de plata (18,9 nm) durante 6 o 24 h (Khan y col. 2015a).

La endocitosis mediada por clatrina puede generar vesículas, con un rango de tamaño de 100-120 nm, que permitan el ingreso de NPs de goethita (Beddoes y col. 2015). Este proceso de endocitosis puede ser dependiente o independiente de la enzima dinamina (Kuhn y col. 2014). Esta enzima, así como el Ca²⁺, facilitan la constricción y el cierre de los poros en los procesos de endocitosis (Shin y col.

2018, Chiang y col. 2014). Los hallazgos de Liu y col. (2018) apoyan esta teoría, ya que no observaron ninguna disfunción en las células endoteliales expuestas a metales y a NPs de óxidos metálicos utilizando un agente que bloquea los canales de Ca²⁺.

También Engisch y Nowycky (1998) han observado que la endocitosis mediada por clatrina es dependiente de la entrada de Ca²⁺. Además, el papel del Ca²⁺ es reconocido en los procesos tanto de endocitosis como de exocitosis. Asumiendo que los canales de Ca²⁺ desempeñan un rol importante en dichos procesos, se decidió investigar la influencia del verapamil, un típico agente bloqueante de dichos canales. En presencia de verapamil y NPs de goethita, los niveles de Fe en *B. glabrata* se mantuvieron similares a los valores basales. Además, de acuerdo a los espectros UV-Visible de la mezcla, no se verificaría ninguna interacción entre ambos. En base a estos resultados, podría sugerirse que estas NPs serían incorporadas por los organismos por mecanismos de endocitosis mediados por clatrina. Sin embargo, deberían realizarse otros estudios para confirmar dicha hipótesis, empleando inhibidores selectivos de los diferentes mecanismos de endocitosis.

Las determinaciones de parámetros biomarcadores se realizaron en organismos expuestos durante 48 h y sin depuración. Bajo estas condiciones, ambas especies presentaron niveles de Fe comparativamente más altos que los organismos controles. Como se discutió anteriormente, esto podría deberse, en *L. variegatus*, a la presencia transitoria de NPs de óxidos de Fe en el tracto gastrointestinal y/o a una adsorción superficial sobre el epitelio, y en *B. glabrata*, a un verdadero proceso de absorción.

Los parámetros biomarcadores fueron determinados en el tejido total de los oligoquetos y en los tejidos blandos de los gasterópodos, exceptuando en estos últimos la región céfalo-pedal en la cual no se había detectado incorporación de NPs.

Los resultados obtenidos para las defensas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas, se resumen en la Tabla 8. Los datos correspondientes a las

defensas antioxidantes en *L. variegatus* expuestos a NPs de goethita se transcriben de Martínez (2017).

| Parámetros biomarcadores | Goethita | | Magnetita |
|--------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | <i>L. variegatus</i> | <i>B. glabrata</i> | <i>L. variegatus</i> |
| SOD | ↑↑ (52 %) | ↑↑ (89 %) | ≈ |
| CAT | ≈ | ↑↑ (50 %) | ≈ |
| t- GSH | ↑↑ (65 %) | ≈ | ≈ |

Tabla 8. Defensas antioxidantas enzimáticas y no enzimáticas determinadas en *L. variegatus* y *B. glabrata* expuestos a NPs de óxidos de Fe (goethita y magnetita) por 48 h.

SOD: Enzima superóxido dismutasa, **CAT:** Enzima catalasa, **t-GSH:** Glutatión total.

↑↑: Aumento estadísticamente significativo con respecto a los controles ($p<0,05$).

≈: No existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles ($p>0,05$).

El aumento observado en la actividad de la enzima SOD tanto en los oligoquetos, como en los gasterópodos expuestos a NPs de goethita sugiere una mayor producción de anión superóxido (O_2^-) en relación a lo observado en los controles.

El aumento de la actividad de la enzima SOD puede conducir a niveles más altos de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) intracelular, el cual, en cierta proporción es producido por la dismutación del anión superóxido mediado por la enzima SOD. Dado que la actividad de la enzima CAT no mostró cambios en los oligoquetos expuestos a NPs de goethita, se podría suponer que el peróxido de hidrógeno podría neutralizarse, al menos en parte, a través de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, la cual utiliza GSH como agente reductor. El aumento observado en la concentración total de este tiol estaría indicando un incremento en su síntesis como respuesta a una situación de estrés.

Por el contrario, los gasterópodos expuestos a NPs podrían estar neutralizando al peróxido de hidrógeno a través de la enzima catalasa, la cual mostró un aumento de la actividad en los organismos expuestos. En cambio, los valores de GSH no se modificaron con respecto a los controles.

Por otro lado, los oligoquetos expuestos a NPs de magnetita no presentaron cambios en ninguna de estas tres defensas antioxidantes analizadas. En principio, estos resultados podrían estar indicando que no hubo exceso de producción de ROS capaz de producir un cambio en el estado redox celular.

Diversos trabajos han reportado aumentos de ROS por efecto de distintas NPs de óxidos metálicos. Sin embargo, se han encontrado diferentes respuestas de las defensas antioxidantes dependiendo de las condiciones de exposición, de la concentración de NP seleccionada, duración de los bioensayos, composición, clase, tamaño y características superficiales de las NPs, como factores más relevantes (Lu y col. 2017, Xia y col. 2017, Sarkar y Sil 2014)

La actividad de las enzimas SOD y CAT aumentó en branquias y glándulas digestivas de la vieira marina *Chlamys farreri* expuestas a NPs de dióxido de titanio (1 mg L^{-1}) durante 14 días (Xia y col. 2017). Las actividades de estas enzimas también se modificaron en *Daphnia magna* expuestos a NPs de cromo y NPs de cobre, mostrando una variación concentración dependiente. Actividades más elevadas, o más bajas que los controles, se encontraron a concentraciones de exposición bajas o altas, respectivamente en estos organismos (Lu y col. 2017).

Por otro lado, la capacidad antioxidante total (TOSC) fue determinada para radicales peroxilos e hidroxilos en *L. variegatus* y en *B. glabrata*. Sólo los gasterópodos expuestos a NPs de goethita mostraron un aumento del 67 % de la capacidad antioxidante frente a radicales peroxilos con respecto a los controles ($p<0,05$). Este incremento reflejaría una rápida respuesta de las diversas defensas con que cuentan esos organismos para la neutralización de dichos radicales.

La susceptibilidad al estrés oxidativo en animales acuáticos generalmente se basa en la determinación de defensas antioxidantes específicas, sus rutas biosintéticas, la localización intracelular, el modo de acción y las respuestas a diferentes factores estresantes (Winston y col. 2004).

En línea con la generación de ROS y su posible derivación en procesos de estrés oxidativo, se evaluaron cambios en la peroxidación de lípidos. Los valores de TBARS no se modificaron en los organismos expuestos a NPs con respecto a los controles, en ninguno de los estudios realizados.

La lectura conjunta de los resultados obtenidos tanto para los oligoquetos como para los gasterópodos expuestos a NPs de goethita indicaría que estas NPs están modificando el estado redox celular y que posiblemente se deba a un aumento en la producción de ROS. En consecuencia, se observaron aumentos en algunas defensas antioxidantes capaces de contrarrestar ese exceso de ROS para evitar posibles daños irreversibles a la membrana celular.

Por otra parte, los resultados obtenidos para *L. variegatus* expuestas a NPs de magnetita indicarían que no hubo aumentos en la generación de ROS o por lo menos que no evidenció un exceso de ROS capaz de modificar el estado redox celular. Este conjunto de resultados, resulta alentador para la utilización de estas NPs en aplicaciones como, por ejemplo, la remediación de sedimentos contaminados.

Por último, la actividad de la enzima AChE no se vio alterada por la exposición de los organismos a las NPs en las condiciones de ensayo.

Medeiros Tavares de Oliveira y col. (2017) tampoco encontraron cambios significativos en la expresión génica de AChE en embriones de pez cebra expuestos a NPs de óxido de Fe. Sin embargo, resultados diferentes fueron encontrados en especies acuáticas por exposición a NPs metálicas. Lu y col. (2017) observaron la inhibición de la AChE en *D. magna* expuesta a NPs de cromo, mientras que una actividad más alta que el control se informó en branquias y glándulas digestivas de la vieira marina *Chlamys ferrari* expuestas a NPs de TiO₂ (Xia y col. 2017).

Todavía no se cuenta con un número significativo de estudios en los cuales se determine la actividad de AChE en invertebrados acuáticos luego de la exposición a NPs. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos y a los

reportados por otros autores su utilidad como parámetro para indicar efectos adversos estaría limitada a la clase de NPs y a la especie biológica.

Al relacionar la incorporación de las NPs de goethita en cada especie seleccionada con los resultados observados para los parámetros bioquímicos, se pueden obtener interesantes comparaciones. Los oligoquetos pudieron retener a las NPs de goethita transitoriamente en el tracto gastrointestinal o bien adsorbidas sobre los epitelios. En cualquier caso, se podría postular un aumento en la generación de ROS, que pudo ser eficazmente neutralizado por los mecanismos de defensa del animal (en particular mediante aumentos de GSH). De esta manera, la capacidad antioxidante total no resultó afectada ni se observaron procesos de peroxidación de lípidos. Los gasterópodos exhibieron una verdadera absorción de estas NPs en sus tejidos, que condujo a una mayor generación de ROS. En esta especie, los niveles de GSH no aumentaron respecto a los valores basales, pero se encontró un aumento en la capacidad antioxidante total frente a radicales peroxilos, de manera tal que tampoco se observaran procesos de peroxidación de lípidos. En cuanto a las NPs de magnetita, era de esperar que los parámetros biomarcadores no se modificaran puesto que no se verificó ningún aumento de Fe en los organismos expuestos.

Como consecuencia de su alta reactividad, las NPs pueden interactuar entre sí mediante la formación de agregados/aglomerados que conducen a un aumento de su tamaño original. Por otra parte, las suspensiones pueden decantar con el tiempo, tal como se observó con las NPs de goethita. Diversos autores han reportado que las sustancias húmicas, ya sean de origen natural o comercial, pueden prevenir estos procesos, dependiendo de factores tales como el pH, la fuerza iónica, las especies y concentración de otros electrolitos presentes (Loosli y col. 2013, Gao y col. 2012, Hu y col. 2010, Handy y col. 2008).

En particular, mediante un proceso de adsorción, y bajo condiciones favorables, el material húmico se puede asociar sobre la superficie de las NPs, formando recubrimientos que promueven la estabilidad de las dispersiones en medio acuoso (Gao y col. 2012). En concordancia con esta teoría, se ha observado que

NPs de plata recubiertas con AH presentaron una menor tendencia a agregarse que cuando estaban recubiertas con citrato (Croteau y col. 2011).

En el presente trabajo, la presencia de AH (20 mg L^{-1}) en el medio de exposición modificó el comportamiento de las NPs de goethita durante las 48 h del bioensayo, permitiendo que las NPs no decantaran durante dicho período. De esta manera, la distribución de las NPs resultó más homogénea durante todo el período de exposición. Este hecho puede influir en su biodisponibilidad.

En virtud de la menor decantación, los oligoquetos se encontraron frente a una menor concentración relativa de NPs en el fondo de los viales, donde permanecen confinados, respecto a los sistemas sin AH. De esta forma, ya sea que las NPs de goethita hubieran sido adsorbidas sobre los epitelios o transitoriamente incorporadas en el tracto digestivo, en ambos casos se esperaría encontrar menores valores de Fe, tal como se comprobó experimentalmente.

En cuanto a los gasterópodos *B. glabrata*, la presencia simultánea de AH también indujo una disminución apreciable en los niveles de Fe, incluso mayor a la observada en los oligoquetos (46% versus 28%). Este resultado ya no es tan simple de explicar en base al comportamiento de los organismos debido a que mientras los oligoquetos se mantienen confinados en el fondo de los recipientes, los gasterópodos dividen su tiempo entre el fondo y la superficie de los mismos (para poder respirar), así como también pueden localizarse en zonas intermedias. No obstante, al estar las NPs más homogéneamente distribuidas, hubo una menor proporción de NPs decantadas que pudieran ser incorporadas por ingestión mediante la rádula. Recordemos además que, en estos gasterópodos, la principal vía de ingreso sería mediante ingesta, resultando despreciables los procesos de adsorción superficial.

Resultados similares fueron hallados por Chen y col. (2014) al exponer la especie acuática *Daphnia magna* a NPs de nC₆₀. Los autores observaron una disminución en la incorporación de NPs de nC₆₀ luego de exponer a los organismos por 8, 12 y 24 h en ensayos semiestáticos a una suspensión de 2 mg L^{-1} de NPs en presencia de 5 mg L^{-1} de AH (Chen y col. 2014).

La exposición a Cd²⁺ y Pb²⁺ permitió verificar que ambas especies son capaces de absorber los metales en sus tejidos.

Particularmente, la absorción de Cd²⁺ en el tejido blando de los gasterópodos pudo ser descripta por una ecuación logarítmica en función de la concentración de exposición. Este resultado se diferencia del reportado para *L. variegatus* en condiciones similares de ensayo. La absorción de Cd²⁺ en el tejido total de *L. variegatus* luego de exponerlos a soluciones de Cd²⁺ (0,025 – 0,300 mg L⁻¹) pudo describirse por una ecuación lineal dependiente de la concentración de Cd²⁺ en el medio de exposición (Piol y col. 2005). El rango de concentraciones de Cd²⁺ estudiado fue seleccionado con el fin de evaluar diferencias en la absorción del metal entre las especies. A concentraciones mayores de 0,300 mg L⁻¹, se reportaron altos niveles de mortalidad para la especie *L. variegatus*, por lo tanto, el estudio se realizó en un rango de concentraciones subletales que incluyen el límite permitido en sistemas acuáticos, según la ley Argentina de Residuos Peligrosos N° 24.051 (Piol 2011).

Por otro lado, la absorción de Pb²⁺ también fue reportada luego de exponer a los oligoquetos y a los gasterópodos por 48 h a soluciones de Pb²⁺ y depurarlos por 24 h. En ambas especies se observó que la absorción de Pb²⁺ podía ser definida por una ecuación lineal (Aisemberg y col. 2005).

Además, según los datos obtenidos se pudo observar que los gasterópodos presentaron una mayor absorción de Cd²⁺ y Pb²⁺ con respecto a *L. variegatus*. La analogía entre el Ca²⁺ y estos metales divalentes es conocida. En consecuencia, estos metales utilizan los mismos transportadores de Ca²⁺ para ingresar a las células (Piol 2011).

Por otro lado, la tasa de absorción de Ca²⁺ puede variar dependiendo del requerimiento de este metal por parte de los organismos. La absorción de Ca²⁺ podría ser elevada en los caracoles debido a que el Ca²⁺ es requerido para la formación y la sustentación de la concha y, por el contrario, la carencia de estructura calcárea en los oligoquetos conduciría a pensar que la absorción de Ca²⁺ por parte de estos organismos sería más baja (Aisemberg y col. 2005). Por lo tanto, esta diferencia en el requerimiento de Ca²⁺, podría explicar en principio

la diferencia en la absorción de Cd²⁺ y Pb²⁺ encontrada entre ambos organismos (Aisemberg y col. 2005).

En los sistemas acuáticos naturales, la mayor proporción de las especies de metales tóxicos se encuentran asociadas a las partículas que conforman el material particulado en suspensión o depositado en los sedimentos (Rand 1995). En consecuencia, sólo una mínima proporción de especies solubles de Cd²⁺ y Pb²⁺ permanecen en la fase acuosa siendo así rápidamente biodisponibles para los organismos.

Las NPs de óxidos de Fe pueden adsorber grandes cantidades de metales sobre su superficie, presentándose como una prometedora forma de remediación de sitios contaminados. Las NPs de goethita por su alta área superficial y su naturaleza química se posicionan como un gran adsorbente de metales pesados (Hua y col. 2012). Por ejemplo, Grossl y col. (1994) observaron que NPs de goethita de 200 nm de longitud, con un área superficial de 50 m² g⁻¹ removían del medio el 100 % del Cu²⁺ en solución a pH 6,00 con una capacidad de adsorción de aproximadamente 150 mg g⁻¹. También, determinadas NPs de magnetita, han evidenciado gran capacidad de remoción para concentraciones iniciales de Pb²⁺ menores a 17 mg L⁻¹ (Recillas y col. 2011).

En el caso de que las NPs de goethita utilizadas en este trabajo fueran capaces de adsorber contaminantes metálicos, se podrían plantear los siguientes escenarios: 1) si la naturaleza de las interacciones NP-Metal se verifica mediante uniones fuertes, de manera que el proceso no resulte reversible, aún cuando las NPs ingresaran en los organismos, se encontraría una disminución en la biodisponibilidad de los metales; 2) si en cambio dichas interacciones son reversibles en el tracto digestivo de los organismos, se verificaría un aumento en la biodisponibilidad de los metales; 3) si las interacciones NP-Metal son fuertes pero adoptan un tamaño de partícula que les impida su ingreso en los organismos, se verificaría un menor nivel de Fe (debido a la menor incorporación de NPs) y una disminución en la biodisponibilidad de los metales.

Frente al escenario 2) se suele aplicar el término “caballo de Troya”, debido a la capacidad de un nanomaterial de actuar como transportador de sustancias

químicas, facilitando la entrada de la sustancia en células u organismos conduciendo así a un aumento en los efectos adversos observados (Naasz y col. 2018). Si bien los autores definen siete escenarios posibles, según la revisión de trabajos reportados, que cubren desde la no modificación de la incorporación y toxicidad de una sustancia química hasta el aumento en la incorporación y toxicidad, la mayor cantidad de reportes indican que más del 50 % de éstos se agrupan bajo el término “Caballo de Troya” (Naasz y col. 2018).

Para estudiar estos procesos, en primer lugar, se investigaron los efectos de los metales contaminantes (Cd o Pb) sobre los niveles basales de Fe en sistemas libres de NPs. Tanto los oligoquetos como los gasterópodos expuestos solamente a Cd o Pb presentaron niveles de Fe similares a los basales. Estos resultados aseguraban que los posibles cambios en los niveles de Fe fueran consecuencia exclusiva de modificaciones en la incorporación de NPs. Por otra parte, no se detectaron niveles apreciables de Cd o Pb en los ejemplares controles, así como tampoco en los expuestos solamente a las NPs, resultados esperables por tratarse de organismos criados en condiciones de laboratorio, libres de fuentes de contaminación.

Para los bioensayos con NPs, los oligoquetos fueron depurados únicamente por 4 h, tiempo que permitía detectar aumentos en los niveles de Fe. Por ende, el mismo período de depuración se efectuó con los gasterópodos. Cuando el medio de exposición contenía la mezcla binaria de NPs y Cd, tanto los oligoquetos como los gasterópodos presentaron los mayores niveles de Fe, sugiriendo un mayor ingreso de NPs. En dichos sistemas binarios, los oligoquetos presentaron niveles de Cd menores que aquellos expuestos solamente al metal, ya sea en presencia de NPs de goethita o magnetita, reflejando un escenario tipo 1), en el cual disminuye la biodisponibilidad del metal. En cambio, se observó un escenario de tipo 2) en los gasterópodos expuestos a nano-goethita, ya que el mayor ingreso de NPs estuvo correlacionado con una mayor concentración de Cd.

Considerando que la composición del medio de exposición fue la misma para ambas especies, la naturaleza de las interacciones NPs-Metal era comparable,

de manera que las diferencias encontradas serían atribuibles a factores netamente biológicos y/o fisiológicos.

Anteriormente se había señalado que los mayores niveles de Fe presentes en los oligoquetos expuestos a NPs podían ser consecuencia de un fenómeno de adsorción superficial a los epitelios. Siguiendo este razonamiento, en los sistemas binarios de NPs y Cd, se verificaría una mayor adsorción superficial de nano-goethita y de nano-magnetita. Como simultáneamente en ambos casos se registró un descenso en los niveles de Cd, se puede inferir que por algún mecanismo disminuyó la biodisponibilidad de dicho metal aún cuando más NPs se hubieran adsorbido. En cambio, si el aumento obedeció a un proceso de incorporación mediante la ingestión de NPs, la liberación del metal dependería de las condiciones presentes en el tracto digestivo de cada especie. Según los resultados, los oligoquetos dispondrían de una menor capacidad de desorción que los gasterópodos. De hecho, en *L. variegatus* el tracto digestivo es mucho más simple, representando básicamente un conducto que permite el pasaje del material particulado. En el caso de los gasterópodos, el sistema digestivo incluye glándulas (hepatopáncreas) de manera que disponen de mayor cantidad y variedad de enzimas. En este medio más complejo, se podría verificar el efecto conocido como *Caballo de Troya*, por el cual el Cd inicialmente asociado a las NPs sería liberado y absorbido en los ejemplares *B. glabrata*.

Mientras que a partir de los sistemas binarios de NPs y Cd se verificó una mayor incorporación de NPs en ambas especies, la situación fue diferente cuando se reemplazó Cd por Pb. Tanto los oligoquetos como los gasterópodos expuestos a las mezclas NPs + Pb, presentaron similares niveles de Fe que aquellos expuestos solamente a las NPs. Por lo tanto, el ingreso de las NPs en los organismos no resultó afectado por la presencia de Pb en el medio. Por otra parte, no se encontraron diferencias en los niveles de Pb entre los organismos expuestos únicamente al metal y aquellos expuestos a los sistemas binarios.

Una posible explicación sería que en los sistemas binarios los dos componentes no interactuasen entre sí ni compitieran por los sitios de ingreso. De esta manera, los organismos absorberían Pb en cantidades comparables en presencia o

ausencia de NPs (y viceversa). Si bien en teoría esta hipótesis es plausible, se contrapone con la tendencia característica del Pb que es la de adsorberse o asociarse con cualquier componente del medio, incluso con las superficies de los recipientes utilizados en los bioensayos (Verrengia Guerrero 1995).

Otra posibilidad sería que en los sistemas binarios el Pb se asociara a las NPs, pero resultara igualmente biodisponible para los organismos, tal como a partir de las soluciones conteniendo únicamente Pb. Para esclarecer cuál es el mecanismo involucrado, se debería recurrir a estudios más específicos para determinar si existe o no una interacción entre las citadas NPs y el Pb.

En cualquier caso, de acuerdo a los resultados encontrados frente a Cd y Pb, ninguna de las NPs estudiadas tendría posibilidad de ser utilizadas en procesos de remediación de dichos metales. Por el contrario, podrían actuar como trasportadores favoreciendo el ingreso de Cd, tal como se observó claramente en el caso de *B. glabrata*.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- 1) Caracterización físico-química de las NPs antes y durante la realización de los bioensayos

A través de las distintas técnicas utilizadas para la caracterización físico-química (TEM, EDAX, DLS) se pudo comprobar que la morfología, estructura, tamaño, composición y pureza de las NPs de óxidos de Fe, eran consistente con las características declaradas por el proveedor. Además, dichas características permanecían constantes en las suspensiones diluidas utilizadas para los bioensayos

La técnica de DLS, que permite establecer la distribución del tamaño de las NPs, no pudo aplicarse frente a NPs con propiedades magnéticas, como las de magnetita, debido a la posibilidad de obtener resultados erróneos por el empleo de campos electro magnéticos para la medición.

La espectrofotometría UV-Visible, permitió obtener, a través de las propiedades ópticas de las NPs, información sobre la estabilidad de las mismas en el medio de exposición, ya sea en presencia o ausencia de ácidos húmicos. Por medio de esta técnica se demostró que tras un período de 48 h las NPs sedimentaban. Sin embargo, en presencia de ácidos húmicos las mismas se mantenían en suspensión.

La determinación de potencial Z refleja la estabilidad de las NPs manufacturadas, siempre y cuando las suspensiones se encuentren en agua ultra pura (tipo MiliQ). En cambio, en presencia de sistemas acuosos que contienen sales minerales, de manera de ser fisiológicamente aptos para los organismos del bioensayo, los valores de potencial Z de las NPs quedan enmascarados por la presencia de las sales.

Si bien se reconoce la necesidad de encarar una completa caracterización físico-química de las NPs antes, durante y al término de los bioensayos, la complejidad de los medios acuosos; las propiedades físico-químicas intrínsecas de las NPs;

las metodologías vigentes; la disponibilidad de instrumentos de medición complejos y costosos (los cuales no forman parte del equipamiento clásico de laboratorios toxicológicos), son los principales factores que conducen a que este objetivo sea todavía muy difícil de satisfacer plenamente.

2) Aspectos relacionados con la toxicocinética de las NPs

El proceso de digestión con HNO_3 (c) de las NPs de óxidos de Fe, seguido por la posterior medición de Fe por AAS, constituye una adecuada aproximación para estimar tanto la concentración de NPs en el medio de exposición a NPs, así como los niveles de incorporación en los organismos del bioensayo.

Mediante dicha aproximación se pusieron de manifiesto interesantes diferencias en los procesos toxicocinéticos entre ambas especies de organismos. Los oligoquetos no son capaces de absorber ninguna de las NPs de Fe seleccionadas. El mayor incremento de nano-goethita observado cuando se depuraron por sólo 4 h podría obedecer a NPs transitoriamente presentes en su tracto gastrointestinal o un fenómeno de adsorción superficial sobre los epitelios. Con un mayor período de depuración, los niveles de Fe en los oligoquetos expuestos retornaron a valores basales. Por ende, *L. variegatus* presentó la misma respuesta frente a dos óxidos de Fe nanoparticulados con diferentes características.

Frente a las NPs de goethita, los gasterópodos de la especie *B. glabrata* presentaron un comportamiento opuesto al de los oligoquetos, ya que fueron capaces de incorporar, distribuir en sus tejidos y retener a dichas NPs, al menos por 24 h. Por otra parte, cualquier proceso de adsorción superficial sobre los epitelios sería muy poco significativo, ya que no se registraron cambios en los niveles de Fe en la región céfalo-pedal, la más expuesta al medio. Además, dicho ingreso fue bloqueado por la presencia simultánea de verapamil en el medio de exposición. De alguna manera, al inhibir los canales de Ca, algunos de los cuales están involucrados en diferentes mecanismos de endocitosis, se podría impedir el ingreso de las NPs a través de esas vías. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes y se deberían realizar otros estudios más específicos para confirmar esta hipótesis.

Teniendo en cuenta que las condiciones de exposición fueron análogas, las diferencias encontradas en la incorporación de nano-goethita entre ambas especies podrían explicarse por causas fisiológicas y/o metabólicas de los organismos. El hecho más significativo es que *L. variegatus* es una especie reconocida como organismo bioindicador para ensayos de toxicidad de sustancias químicas contaminantes, en escala no-nano, por las Agencias Ambientales más importantes del mundo desarrollado (ASTM, US EPA, OECD). Además, su uso también ha sido recomendado para evaluar la toxicidad de NMs. En cambio, ninguna especie de molusco gasterópodo ha alcanzado todavía ese estatus. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, sería muy importante incluirlos, ya que los ejemplares de *B. glabrata* demostraron tener la capacidad de incorporar y retener a las NPs de goethita en sus tejidos, pudiendo dar lugar a un proceso de acumulación. Bajo estas circunstancias, *B. glabrata* sería un mejor organismo bioindicador del impacto de los NMs sobre los ecosistemas.

3) Respuestas subcelulares

En relación a las respuestas subcelulares, se observaron aumentos en algunas defensas antioxidantes tanto en los oligoquetos como en los gasterópodos por la exposición a NPs de goethita. En cambio, las NPs de magnetita no indujeron cambios en los parámetros biomarcadores de los oligoquetos. Además, las NPs seleccionadas no produjeron modificaciones en la actividad de la enzima AChE en ninguna especie de organismo.

Estos resultados ponen de manifiesto que aún frente a un proceso de adsorción superficial o presencia transitoria de NPs de goethita en el tracto digestivo, es posible encontrar efectos sobre las defensas antioxidantes. Debido a que las alteraciones encontradas fueron aumentos de las defensas antioxidantes, se puede inferir que los organismos exhibían una capacidad para contrarrestar la mayor generación de ROS. En consecuencia, resulta coherente que bajo estas condiciones no se hayan observado daños de peroxidación lipídica.

4) Presencia simultánea de NPs y otras sustancias químicas de origen natural o antropogénico

La presencia simultánea de una solución de ácidos húmicos o de Cd alteró la biodisponibilidad de las NPs de goethita, mientras que la solución de Pb no tuvo ese efecto. A su vez, en ambas especies se observó que estas NPs tuvieron influencia en el ingreso de Cd, pero no de Pb.

Estos resultados ponen en evidencia que tanto la presencia de sustancias químicas naturales (caso de ácidos húmicos) como de algunos agentes contaminantes (Cd) pueden condicionar el destino ambiental, y por ende los efectos ecotoxicológicos, de las NPs una vez que éstas alcanzan los sistemas acuáticos naturales. A su vez, las NPs pueden llegar a actuar como eficaces transportadores de ciertos contaminantes (caso del Cd), exacerbando así la toxicidad resultante en los organismos.

Finalmente, también sería necesario encarar estudios crónicos para obtener mayor información sobre la incorporación y potencial bioacumulación, así como otros efectos tóxicos causados por estas NPs en organismos invertebrados, con el fin de evaluar cabalmente su impacto ecotoxicológico en sistemas acuáticos.

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

A

- Abele, D., Vazquez-Medina, J. P., y Zenteno-Savin, T. (Eds.). (2012). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. John Wiley & Sons.
- Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L., y MacCarthy, P. (Eds.). (1985). *In Humic substances in soil, sediment, and water*. Wiley interscience.
- Aisemberg, J., Nahabedian, D. E., Wider, E. A., y Verrengia Guerrero, N. R. (2005). Comparative study on two freshwater invertebrates for monitoring environmental lead exposure. *Toxicology*, 210(1), 45-53.
- Alchetron: The free social encyclopedia. *Biomphalaria glabrata*. www.alchetron.com/Biomphalaria-glabrata. Consultada en el año 2019a.
- Alchetron: The free social encyclopedia. *Lumbriculus variegatus*. www.alchetron.com/Lumbriculus-variegatus#-. Consultada en el año 2019b.
- Allsopp, M., Walters, A., y Santillo, D. (2007). Nanotechnologies and nanomaterials in electrical and electronic goods: A review of uses and health concerns. *Greenpeace Research Laboratories, London*.
- Ansari, M. O., Ahmad, M., Parveen, N., Ahmad, S., Jameel, S., y Shadab, G. G. H. A. (2017). Iron oxide nanoparticles-synthesis, surface modification, applications and toxicity: a review. *Materials Focus*, 6(3), 269-279.
- ASTM. (2010) Standard test methods for measuring the toxicity of sediment associated contaminants with fresh water invertebrates (ASTM E1706-00). *Annual Book of ASTM Standards*. West Conshohocken, PA, USA.
- Ali, A., Hira Zafar, M. Z., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., y Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, science and applications*, 9, 49-67.

B

Baker, T. J., Tyler, C. R., y Galloway, T. S. (2014). Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental pollution*, 186, 257-271.

Barber, D. J., y Freestone, I. C. (1990). An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, 32(1), 33-45.

Beddoes, C. M., Case, C. P., y Briscoe, W. H. (2015). Understanding nanoparticle cellular entry: a physicochemical perspective. *Advances in colloid and interface science*, 218, 48-68.

Boverhof, D. R., Bramante, C. M., Butala, J. H., Clancy, S. F., Lafranconi, M., West, J., y Gordon, S. C. (2015). Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 137-150.

British Museum. www.britishmuseum.org. Consultada en el año 2018.

Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., Schulz, R., y Wagner, S. (2018). Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1-17.

Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., y Urban, P. L. (2009). Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste management*, 29(9), 2587-2595.

C

Cáceres Wenzel, M. I., Gigena, J., Fuchs, J. S., Oneto, M. L., Cochón, A. C., Casabé, N. B., y Verrengia Guerrero, N. R. (2016). Nanopartículas de goethita en *Eisenia andrei*: Ingreso, efectos subcelulares y su influencia en la acumulación de Cd y Pb. *Química Viva*, 15(2), 29-43.

Camusso, M., Polesello, S., Valsecchi, S., y Vignati, D. A. (2012). Importance of dietary uptake of trace elements in the benthic deposit-feeding *Lumbriculus variegatus*. *Trends in Analytical Chemistry*, 36, 103-112.

Chen, Q., Yin, D., Li, J., y Hu, X. (2014). The effects of humic acid on the uptake and depuration of fullerene aqueous suspensions in two aquatic organisms. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(5), 1090-1097.

Chiang, H. C., Shin, W., Zhao, W. D., Hamid, E., Sheng, J., Baydyuk, M., Wen, P. J., Jin, A., Momboisse, F., y Wu, L. G. (2014). Post-fusion structural changes and their roles in exocytosis and endocytosis of dense-core vesicles. *Nature communications*, 5, 3356.

Cochón, A. C., Della Penna, A. B., Kristoff, G., Piol, M. N., De Viale, L. S. M., y Verrengia Guerrero, N. R. (2007). Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. *Ecotoxicology and environmental safety*, 68(2), 286-292.

Cornell, R. M., y Schwertmann, U. (Eds.). (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons.

Corrales, L. C., y Muñoz Ariza, M. M. (2012). Oxidative Stress: origin, evolution and consequences of oxygen toxicity. *Nova*, 10(18), 213-225.

Crane, M., Handy, R. D., Garrod, J., y Owen, R. (2008). Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(5), 421-437.

Referencias bibliográficas

Croteau, M. N., Misra, S. K., Luoma, S. N., y Valsami-Jones, E. (2011). Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. *Environmental science & technology*, 45(15), 6600-6607.

D

DANA 2.0. www.nanopartikel.info. Consultada en el año 2018.

Daraio, C., y Jin, S. (2012). Synthesis and patterning methods for nanostructures useful for biological applications. En *Nanotechnology for biology and medicine* (pp. 27-44). Springer, New York, NY.

Davies, N. A., Edwards, P. A., Lawrence, M. A. M., Taylor, M. G., y Simkiss, K. (1999). Influence of particle surfaces on the bioavailability to different species of 2, 4-dichlorophenol and pentachlorophenol. *Environmental science & technology*, 33(14), 2465-2468.

Dawson, T. D., Lott, K. G., Leonard, E. N., y Mount, D. R. (2003). Time course of metal loss in *Lumbriculus variegatus* following sediment exposure. *Environmental toxicology and chemistry*, 22(4), 886-889.

De Freitas Tallarico, L., Miyasato, y P. A., y Nakano, E. (2016). Rearing and Maintenance of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): Adults and Embryos under Laboratory Conditions. *Annals of Aquaculture and Research*, 3(1), 1013.

DeLoid, G., Cohen, J. M., Darrah, T., Derk, R., Rojanasakul, L., Pyrgiotakis, G., Wohlleben, W., y Demokritou, P. (2014). Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry. *Nature communications*, 5, 3514.

Referencias bibliográficas

- Drewes C. *Lumbriculus variegatus*: A Biology Profile.
www.eeob.iastate.edu/faculty/DrewesC/htdocs/Lvgen4.htm. Consultada en el año 2018a.
- Drewes C. Culturing *Lumbriculus variegatus* (California blackworms)
www.eeob.iastate.edu/faculty/DrewesC/htdocs. Consultada en el año 2018b.

E

Ealias, A. M., y Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. En *IOP Conference. Series: Materials Science Engineering*, 263, 032019.

ECHA. (2017). Guidance on information requirements and chemical safety assessment Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7b - Endpoint specific guidance (ECHA-17-G-15-EN). *European Chemicals Agency*.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

Engisch, K. L., y Nowycky, M. C. (1998). Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 506(3), 591-608.

England Public Health. (2017). Lead Toxicological Overview. *PHE publications gateway number*, 2014790, 1-15.

F

Fadeel, B., Fornara, A., Toprak, M. S., y Bhattacharya, K. (2015). Keeping it real: The importance of material characterization in nanotoxicology. *Biochemical and biophysical research communications*, 468(3), 498-503.

Fard, J. K., Jafari, S., y Eghbal, M. A. (2015). A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(4), 447-454.

Fernández, D. G., Mancipe, L. C., y Fernández, D. C. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18(1), 84-92.

Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *California Institute of Technology, Engineering and Science magazine*.

Flora, G., Gupta, D., y Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary toxicology*, 5(2), 47-58.

G

Gao, J., Powers, K., Wang, Y., Zhou, H., Roberts, S. M., Moudgil, B. M., Koopman, B., y Barber, D. S. (2012). Influence of Suwannee River humic acid on particle properties and toxicity of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 89(1), 96-101.

García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puntes, V., Barata, C., Font, X., y Sánchez, A. (2011). Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination*, 269, 136-141.

Referencias bibliográficas

German Environment Agency. (2016) Nanomaterials in the Environment – Current State of Knowledge and Regulations on Chemical Safety Recommendations of the German Environment Agency.
www.umweltbundesamt.de/publikationen/nanomaterials-in-the-environment.

Gordon, S. (2016). Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, 44(3), 463-475.

Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*, 106(1), 207-212.

Grossl, P. R., Sparks, D. L., y Ainsworth, C. C. (1994). Rapid kinetics of Cu (II) adsorption/desorption on goethite. *Environmental science & technology*, 28(8), 1422-1429.

Guo, H., y Barnard, A. S. (2013). Naturally occurring iron oxide nanoparticles: morphology, surface chemistry and environmental stability. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(1), 27-42.

H

Han, S. K., Hwang, T. M., Yoon, Y., y Kang, J. W. (2011). Evidence of singlet oxygen and hydroxyl radical formation in aqueous goethite suspension using spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR). *Chemosphere*, 84(8), 1095-1101.

Handy, R. D., Owen, R., y Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315-325.

Referencias bibliográficas

- Handy, R. D., van den Brink, N., Chappell, M., Mühling, M., Behra, R., Dušinská, M., Simpson, P., Ahtiainen, J., Jha, A. N., Seiter, J., Bednar, A., Kennedy, A., Fernandes, T. F., y Riediker, M. (2012). Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far?. *Ecotoxicology*, 21(4), 933-972.
- Hartmann, N. B., Legros, S., Von der Kammer, F., Hofmann, T., y Baun, A. (2012). The potential of TiO₂ nanoparticles as carriers for cadmium uptake in *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 118, 1-8.
- Hessian Ministry of Economy, Transport, Urban and Regional Development (Germany). (2008). Application of Nano- Technologies in the Energy. *Aktionslinie Hessen-Nanotech*, 9.
- Hiemstra, T. (2015). Formation, stability, and solubility of metal oxide nanoparticles: Surface entropy, enthalpy, and free energy of ferrihydrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 158, 179-198.
- Horikoshi, S., y Serpone, N. (Eds.). (2013). *Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- Hu, J., Wang, D., Wang, J., y Wang, J. (2012). Bioaccumulation of Fe₂O₃ (magnetic) nanoparticles in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental pollution*, 162, 216-222.
- Hu, J. D., Zevi, Y., Kou, X. M., Xiao, J., Wang, X. J., y Jin, Y. (2010). Effect of dissolved organic matter on the stability of magnetite nanoparticles under different pH and ionic strength conditions. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3477-3489.
- Hua, M., Zhang, S., Pan, B., Zhang, W., Lv, L., y Zhang, Q. (2012). Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: a review. *Journal of hazardous materials*, 211, 317-331.

Referencias bibliográficas

ISO. (2015). Nanotechnologies (ISO/TS 80004:2015). *International Organization of Standardization*.

ISSP. (2014). Timeline: Nanotechnology. Institute for Science, Society and Policy, University of Ottawa.

https://issp.uottawa.ca/sites/issp.uottawa.ca/files/issp2014_nanotechnologytimeline.pdf

ITIS: Integrated Taxonomic Information System. Standard report: *Biomphalaria glabrata*. www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=76637#null. Consultada en el año 2018.

IUPAC. (1997). The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils. *Pure and Applied Chemistry*, 69(7), 1571-1600.

J

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., y Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7(2), 60-72.

Je Jo, H. J., Choi, J. W., Lee, S. H., y Hong, S. W. (2012). Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: the importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. *Journal of hazardous materials*, 227, 301-308.

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., y Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9(1), 1050-1074.

Referencias bibliográficas

Jurberg P, Cunha RA, y Rodrigues ML. (1997). Comportamiento de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda: Planorbidae) -I. Morfofisiología de la cavidad del manto. *Memorias Del Instituto Oswaldo Cruz*, 92(2), 287–295.

K

Kaur, S., Baynes, A., Lockyer, A. E., Routledge, E. J., Jones, C. S., Noble, L. R., y Jobling, S. (2016). Steroid androgen exposure during development has no effect on reproductive physiology of *Biomphalaria glabrata*. *PloS one*, 11(7), e0159852.

Khan, F. R., Misra, S. K., Bury, N. R., Smith, B. D., Rainbow, P. S., Luoma, S. N., y Valsami-Jones, E. (2015a). Inhibition of potential uptake pathways for silver nanoparticles in the estuarine snail *Peringia ulvae*. *Nanotoxicology*, 9(4), 493-501.

Khan, F. R., Paul, K. B., Dybowska, A. D., Valsami-Jones, E., Lead, J. R., Stone, V., y Fernandes, T. F. (2015b). Accumulation dynamics and acute toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*: implications for metal modeling approaches. *Environmental science & technology*, 49(7), 4389-4397.

Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.

Klaassen, C. D., y Amdur, M. O. (Eds.). (2013). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. McGraw-Hill.

Kohen, R., y Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.

Referencias bibliográficas

Krzyżewska, I., Kyzioł-Komosińska, J., Rosik-Dulewska, C., Czupioł, J., y Antoszczyszyn-Szpicka, P. (2016). Inorganic nanomaterials in the aquatic environment: behavior, toxicity, and interaction with environmental elements. *Archives of Environmental Protection*, 42(1), 87-101.

Kuhn, D. A., Vanhecke, D., Michen, B., Blank, F., Gehr, P., Petri-Fink, A., y Rothen-Rutishauser, B. (2014). Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5(1), 1625-1636.

L

Lead, J. R., y Smith, E. (Eds.). (2009). *Environmental and human health impacts of nanotechnology*. John Wiley & Sons.

Ley N° 24.051 (1991). Ley Nacional de Residuos Peligrosos. Decreto Reglamentario N° 831/93 – Anexo II, Tabla 2 - Niveles Guía de Calidad de Agua para Protección de Vida Acuática. Agua Dulce Superficial. Resolución 242/93 - Normas para los Vertidos de Establecimientos Industriales o Especiales Alcanzados por el Decreto 674/89.

Liu, Y., Tourbin, M., Lachaize, S., y Guiraud, P. (2014). Nanoparticles in wastewaters: hazards, fate and remediation. *Powder technology*, 255, 149-156.

Liu, Y., Yoo, E., Han, C., Mahler, G. J., y Doiron, A. L. (2018). Endothelial barrier dysfunction induced by nanoparticle exposure through actin remodeling via caveolae/raft-regulated calcium signalling. *NanoImpact*, 11, 82-91.

Loosli, F., Le Coustumer, P., y Stoll, S. (2013). TiO₂ nanoparticles aggregation and disaggregation in presence of alginate and Suwannee River humic acids. pH and concentration effects on nanoparticle stability. *Water research*, 47(16), 6052-6063.

Referencias bibliográficas

Lovisolo, D., Dionisi, M., Ruffinatti, y F. A., Distasi, C. (2018). Nanoparticles and potential neurotoxicity: Focus on molecular mechanisms. *AIMS Molecular Science*, 5, 1-13.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.

Lu, G., Yang, H., Xia, J., Zong, Y., y Liu, J. (2017). Toxicity of Cu and Cr nanoparticles to *Daphnia magna*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(1), 18.

Lux Research (2006) *Nanotechnology Commercialization – Industry and Environmental Impacts* Woodrow Wilson International Center for Scholars, 1-26.

Lux Research (2015) *Nanotechnology Update: U.S. Leads in Government Spending Amidst Increased Spending Across Asia*, 1–2.

M

Mäkie, P., Westin, G., Persson, P., y Osterlund, L. (2011). Adsorption of trimethyl phosphate on maghemite, hematite, and goethite nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(32), 8948-8959.

Martínez, M. L. (2017). *Estudios de efectos de la exposición a Tributilestaño (TBT) en invertebrados dulceacuícolas* (Disertación de doctorado, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Mcpherson PS, Ritter B, Wendland B. Clathrin-Mediated Endocytosis. *NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health*. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6479/?report=printable. Consultada en el año 2018.

Referencias bibliográficas

Medeiros Tavares de Oliveira, G., Magno Nunes de Oliveira, E., Carneiro Brandão Pereira, T., Meurer Papaléo, R., y Reis Bogo, M. (2017). Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(12), 389.

Molena, I.L., Gigena, J., Cochón, A. C., Verrengia Guerrero, N. R. (2015). Efectos de Nano-Hidroxiapatita en *Lumbriculus variegatus*.
www.researchgate.net/profile/Maria_Dos_Santos_AFONSO2/publication/287205450_Libro_de_Resumenes_del_II_Congreso_Internacional_de_Ciencia_y_Tecnologia_Ambiental_y_II_Congreso_Nacional_de_la_Sociedad_Argentina_de_Ciencia_y_Tecnologia_Ambiental/links/5673114d08aee7a427436e72/Libro-de-Resumenes-del-II-Congreso-Internacional-de-Ciencia-y-Tecnologia-Ambiental-y-II-Congreso-Nacional-de-la-Sociedad-Argentina-de-Ciencia-y-Tecnologia-Ambiental.pdf, 65.

Mount, D. R., Dawson, T. D., y Burkhard, L. P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(6), 1244-1249.

Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., y Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871-12934.

N

Naasz, S., Altenburger, R., y Kühnel, D. (2018). Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: The Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity. *Science of the Total Environment*, 635, 1170-1181.

Referencias bibliográficas

NMIA: National Measurement Institute (Australia). (2012). Nanoparticle Characterisation Instrumentation. www.measurement.gov.au/nano.

NNI: National Nanotechnology Initiative. www.nano.gov/timeline. Consultada en el año 2016.

NNI: National Nanotechnology Initiative. www.nano.gov/you/nanotechnology?benefits Consultada en el año 2017.

Nonell, S., y Flors, C. (Eds.). (2016). *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences* (Vol. 1). Royal Society of Chemistry.

Nordic Council of Ministers. (2003a) Cadmium Review.
https://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf

Nordic Council of Ministers. (2003b) Lead Review.
https://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_lead.pdf

Q

OECD, T. 225. 2007. Sediment Water *Lumbriculus* Toxicity Test Using Spiked Sediment. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, 2*.

Okocha, R. C., y Adedeji, O. B. (2011). Overview of cadmium toxicity in fish. *Journal of Applied Sciences Research*, 7(7), 1195-1207.

Oliveira-Filho, E. C., Sousa Filho, J., Novais, L. A., Peternele, W. S., Azevedo, R. B., y Grisolia, C. K. (2016). Effects of γ -Fe₂O₃ nanoparticles on the survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and their elimination from this benthic aquatic snail. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18362-18368.

P

Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., y Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of applied pharmaceutical science*, 1(6), 228-234.

Park SI, y Quate CF (1987) Scanning Tunneling Microscope. *Review of Scientific Instruments*, 58(11), 2010-2017.

Patlevič, P., Vašková, J., Švorc Jr, P., Vaško, L., y Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integrative medicine research*, 5(4), 250-258.

Peijnenburg, W. J., Baalousha, M., Chen, J., Chaudry, Q., Von der kammer, F., Kuhlbusch, T. A., Lead, J., Nickel, C., Quik, J. T. K., Renker, M., Wang, Z., y Koelmans, A. A. (2015). A review of the properties and processes determining the fate of engineered nanomaterials in the aquatic environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(19), 2084-2134.

Petersen, E. J., Huang, Q., Weber Jr, y W. J. (2008). Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Lumbriculus variegatus*. *Environmental health perspectives*, 116(4), 496-500.

Piol, M.N. (2011). *Destino y Efectos de Cadmio y Níquel en Sistemas Acuáticos* (Disertación de doctorado, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Piol, M. N., López, A. G., Miño, L. A., Dos Santos Afonso, M., y Verrengia Guerrero, N. R. (2005). Influence of humic acids on the toxicity of cadmium to *Lumbriculus variegatus*. *Revista brasilera de toxicología*, 18(2), 93-98.

Pisoschi, A. M., y Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.

R

Raiswell, R. (2011). Iron transport from the continents to the open ocean: The aging–rejuvenation cycle. *Elements*, 7(2), 101-106.

Rajala, J. (2017). Behaviour of sediment-associated silver nanoparticles and their toxicity to *Lumbriculus variegatus*. *Jyväskylä studies in biological and environmental science*, (331).

Rajput, N. (2015). Methods of preparation of nanoparticles-A review. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 7(6), 1806-1811.

Rand, G. M. (Ed.). (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC press.

Recillas, S., García, A., González, E., Casals, E., Puntes, V., Sanchez, A., y Font, X. (2011). Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead from water: Toxicity of nanoparticles and derived compounds. *Desalination*, 277(1-3), 213-220.

Regoli, F. (2000). Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 50(4), 351-361.

Regoli, F., y Winston, G. W. (1998). Applications of a new method for measuring the total oxyradical scavenging capacity in marine invertebrates. *Marine environmental research*, 46(1-5), 439-442.

Regoli, F., y Winston, G. W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and applied pharmacology*, 156(2), 96-105.

Reibold, M., Paufler, P., Levin, A. A., Kochmann, W., Pätzke, N., y Meyer, D. C. (2009). Discovery of nanotubes in ancient Damascus steel. En *Physics and Engineering of New Materials* (pp. 305-310). Springer, Berlin, Heidelberg.

Referencias bibliográficas

Remya, A. S., Ramesh, M., Saravanan, M., Poopal, R. K., Bharathi, S., y Nataraj, D. (2015). Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, iono regulation and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity. *Journal of King Saud University-Science*, 27(2), 151-160.

RIVM. (2015). Assessing health & environmental risks of nanoparticles: Current state of affairs in policy, science and areas of application. RIVM Report 2014-0157. *National Institute for Public Health and the Environment: Bilthoven, the Netherlands*. <http://www.rivm.nl/dsresource>.

Romih, T., Drašler, B., Jemec, A., Drobne, D., Novak, S., Golobič, M., Makovec, D., Susič, R., y Kogej, K. (2015). Bioavailability of cobalt and iron from citric-acid-adsorbed CoFe₂O₄ nanoparticles in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Science of the Total Environment*, 508, 76-84.

Royer Jr, W. E., Sharma, H., Strand, K., Knapp, J. E., y Bhyravbhatla, B. (2006). *Lumbricus erythrocytisin* at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. *Structure*, 14(7), 1167-1177.

S

Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2(1), 3.

Sánchez-Chávez, G., y Salceda, R. (2008). Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44-51.

Sarkar, A., y Sil, P. C. (2014). Iron oxide nanoparticles mediated cytotoxicity via PI3K/AKT pathway: role of quercetin. *Food and Chemical Toxicology*, 71, 106-115.

Schmid, O., y Stoeger, T. (2016). Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung. *Journal of Aerosol Science*, 99, 133-143.

Referencias bibliográficas

Shin, W., Ge, L., Arpino, G., Villarreal, S. A., Hamid, E., Liu, H., Zhao, W. D., Wen, P. J., Chiang, H. C., y Wu, L. G. (2018). Visualization of membrane pore in live cells reveals a dynamic-pore theory governing fusion and endocytosis. *Cell*, 173(4), 934-945.

Sigma Aldrich.

www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/747254?lang=es®ion=AR.

Consultada en el año 2014.

Simkiss, K., Edwards, P. A., Lawrence, M. A. M., Davies, N. A., y Taylor, M. G. (2000). The use of hydrophobic resins as analogues for sediment testing. *Environmental science & technology*, 34(12), 2388-2392.

Skjolding, L. M., Sørensen, S. N., Hartmann, N. B., Hjorth, R., Hansen, S. F., y Baun, A. (2016). Aquatic ecotoxicity testing of nanoparticles—the quest to disclose nanoparticle effects. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(49), 15224-15239.

Soenen, S. J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J. M., Parak, W. J., De Smedt, S. C., y Braeckmans, K. (2011). Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano today*, 6(5), 446-465.

Stanley, J. K., Coleman, J. G., Weiss Jr, C. A., y Steevens, J. A. (2010). Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(2), 422-429.

Stevenson, I. L., y Schnitzer, M. (1982). Transmission Electron Microscopy of Extracted Fulvic and Humic acids. *Soil Science*, 133(3), 179-185.

T

TirafERRI, A., Hernandez, L. A. S., Bianco, C., Tosco, T., y Sethi, R. (2017). Colloidal behavior of goethite nanoparticles modified with humic acid and implications for aquifer reclamation. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(3), 107.

Tiwari, D. K., Behari, J., y Sen, P. (2008). Application of nanoparticles in waste water treatment. *World Applied Sciences Journal*, 3(3), 417-433.

Toledo, R., y Fried, B. (Eds.). (2011). *Biomphalaria snails and larval trematodes*. Springer Science & Business Media.

Tong, S., Schirnding, Y. E. V., y Prapamontol, T. (2000). Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the world health organization*, 78, 1068-1077.

Tweney, R. D. (2002). Epistemic artifacts: Michael Faraday's search for the optical effects of gold. En *Model-Based Reasoning* (pp. 287-303). Springer, Boston, MA.

U

US EPA. (2016) Aquatic life, ambient water quality criteria: cadmium (EPA 820-R-16-002). *Office of Science and Technology, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency*.

US EPA. (2009) Assessing the use and application of zero-valent iron nanoparticle technology for remediation at contaminated sites. (August). *Office of Solid Waste and Emergency Response and Office of Superfund Remediation and Technology Innovation, U.S. Environmental Protection Agency*.

Referencias bibliográficas

US EPA. (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms (EPA-821-R-02-012). *Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency.*

US EPA. (2000) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates (EPA/600/R-99/064). *Office of Research and Development Mid-Continent Ecology Division, Office of Science and Technology and Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency.*

US EPA. (2007) Nanotechnology white paper (EPA 100/B-07/001). *Science Policy Council, U.S. Environmental Protection Agency.*

US EPA. (2008) Sampling and analysis of nanomaterials in the environment: a state-of-the-science review final report (EPA/600/R-08/098). *Office of Research and Development National Exposure Research Laboratory Environmental Sciences Division, US Environmental Protection Agency.*

US EPA. (2014) Technical fact sheet – nanomaterials (EPA 505-F-14-002). *US Environmental Protection Agency.*

US EPA. (1990) Test methods to estimate the acute and chronic toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using the aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus* (00526). *US Environmental Protection Agency.*

US FDA. (2014). Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology. *Adm: US Food Drug.*

V

Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., y Domingos, R. F. (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: a critical overview. *Aquatic toxicology*, 170, 162-174.

Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., y Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6(1), 1769-1780.

Verrengia Guerrero, N. R. (1995). *Contaminantes metálicos en el Río de La Plata: Monitoreo del sistema acuático y estudio de algunos efectos tóxicos en moluscos bivalvos por medio de bioensayos* (Disertación de doctorado, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Verrengia Guerrero, N. R. (2007). Predicting the uptake and bioaccumulation of organic pollutants from natural sediments. *Environmental pollution: new research*. Nova Science Publishers, New York, USA, 141-184.

Verrengia Guerrero, N. R., Nahabedian, D. E., y Wider, E. A. (2000). Analysis of some factors that may modify the bioavailability of cadmium and lead by *Biomphalaria glabrata*. *Environmental toxicology and chemistry*, 19(11), 2762-2768.

Verrengia Guerrero, N. R., y Kesten, E. M. (1993). Levels of heavy metals in biota from the La Plata River. *Environmental toxicology and water quality*, 8(3), 335-344.

Villacís-García, M., Ugalde-Arzate, M., Vaca-Escobar, K., Villalobos, M., y Martínez-Villegas, N. (2015). Laboratory synthesis of goethite and ferrihydrite of controlled particle sizes. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 67(3), 433-446.

W

Wang, Z., Zhao, J., Li, F., Gao, D., y Xing, B. (2009). Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*, 77(1), 67-73.

Wilbur, K. M. (Ed.). (1983). *The Mollusca*. Academic Press.

Wilson, N. (2018). Nanoparticles: environmental problems or problem solvers?. *BioScience*, 68(4), 241-246.

Winston, G. W., Lemaire, D. G., y Lee, R. F. (2004). Antioxidants and total oxyradical scavenging capacity during grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 281-288.

Winston, G. W., Regoli, F., Dugas Jr, A. J., Fong, J. H., y Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3), 480-493.

X

Xia, B., Zhu, L., Han, Q., Sun, X., Chen, B., y Qu, K. (2017). Effects of TiO₂ nanoparticles at predicted environmental relevant concentration on the marine scallop *Chlamys farreri*: An integrated biomarker approach. *Environmental toxicology and pharmacology*, 50, 128-135.

Xiaoli, F., y Longquan, S. (2018). Neurotoxicity of nanomaterials. En *Emerging Nanotechnologies in Dentistry* (pp. 421-444). William Andrew Publishing.

Referencias bibliográficas

Xu, L., Liang, H. W., Yang, Y., y Yu, S. H. (2018). Stability and reactivity: positive and negative aspects for nanoparticle processing. *Chemical reviews*, 118(7), 3209-3250.