



## Efecto tóxico de nanopartículas de plata en clorofitas: *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*

Elva Guadalupe Robles Jarero<sup>a,\*</sup>, F. Javier Gálvez Gastélun<sup>b</sup>, Irinea Yáñez Sánchez<sup>c</sup>, Celso Velásquez Ordóñez<sup>c</sup>, Ma. Luisa Ojeda Martínez<sup>c</sup>.

<sup>a</sup>Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, erobles38@gmail.com.

<sup>b</sup>Centro Universitario de la Salud, Universidad de Guadalajara, galvez1975@hotmail.com

<sup>c</sup>Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara, irisys70@hotmail.com, celsovo7@hotmail.com, luisaojedam@yahoo.com.mx

### RESUMEN.

Las nanopartículas de plata (1-100 nm) son utilizadas en la industria médica, cosmética, textil y en productos domésticos, debido a su potencial poder antibacterial. De acuerdo a esta amplia gama de aplicaciones, existe una creciente preocupación por la seguridad de su uso por el hombre y el impacto en el ambiente. El presente estudio tiene como propósito dilucidar los efectos citotóxicos que causan las nanopartículas de plata de 5-10 nm en fitoplancton de agua dulce, como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en su biomasa (Clorofila-*a*) y morfología al someterse a diferentes tratamientos *ex situ*. Materiales y método. Las microalgas se obtuvieron del Lago de Chapala, Jalisco y se mantuvieron en condiciones de laboratorio con luz blanca continua y temperatura constante de 25°C ± 1°C. Se realizaron tratamientos experimentales por triplicado: dos controles (medio de cultivo Bristol y vehículo PVP) y tres con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (0.01, 0.1 y 1 mg/L), durante 24 horas. Resultados. Se observaron diferencias significativas en la concentración de Clorofila-*a* en los diferentes tratamientos con nanopartículas de plata, de acuerdo al análisis estadístico ( $p \leq 0.05$ ) principalmente con las dosis intermedia y de mayor concentración (0.1 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>), disminuyendo este pigmento hasta un 50 y 95% respectivamente. Además se apreció un impacto importante en la morfología de las microalgas respecto al grupo control, de acuerdo al análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM). Discusión y conclusión. Los resultados de clorofila-*a* mostraron un mayor efecto en las concentraciones intermedia y alta, que los reportados por otros investigadores, asociado al menor tamaño de las nanopartículas. De acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que las AgNPs tienen un efecto negativo en las microalgas y estas alteraciones pueden tener graves consecuencias a mediano plazo, en la estructura y función de los ecosistemas acuáticos.

### 1. INTRODUCCIÓN.

Las nanopartículas de plata son arreglos ordenados de átomos de plata con un diámetro que va de 1 a 100 nm. Se estima que de todos los nanomateriales utilizados en productos para el consumo, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las que tienen una mayor demanda. Se utilizan en electrónica, ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en la industria médico-farmacéutica y alimentaria [1, 2]. Debido a su tamaño, no son retenidas por los filtros de aguas residuales y existe un riesgo potencial para los ambientes naturales. Por ello, es



necesario que los productos fabricados con nanopartículas así como sus aplicaciones sean seguros tanto para la salud de las personas como del medio ambiente.

Algunos estudios han mostrado que la toxicidad intrínseca de las AgNPs depende de una serie de factores como son el tamaño, la forma, el área superficial, la carga superficial, la solubilidad y el estado de aglomeración. Asimismo, numerosas investigaciones *in vitro* indican que las AgNPs son tóxicas para las células de bacterias, plantas y mamíferos. Además, consecuencias inflamatorias, oxidativas y genotóxicas están asociadas con la exposición de AgNPs. Este estudio muestra resultados preliminares de vías de exposición y los efectos tóxicos implicados debido al incremento en su utilidad, las nanopartículas de plata pudieran ponerse en contacto con microorganismos en el ambiente y alterar, de alguna forma, el equilibrio ecológico. A pesar de que en un sentido emergente, los nuevos nanomateriales bien diseñados seguirán estudiándose y utilizándose para un amplio mundo de aplicaciones, existe también una gran preocupación por una creciente toxicidad inesperada de sus propiedades, como alta reactividad, formas complejas poco comunes y su accesibilidad a las células [3].

## 2. TEORÍA.

Actualmente resulta difícil evaluar adecuadamente los efectos biológicos de las nanopartículas por la cantidad de factores que intervienen en el consumo y excreción celular y el comportamiento *in vivo* de los organismos. Cualquier cambio en la composición, tamaño, morfología, ruta de exposición y dosis, pueden afectar significativamente la respuesta inmunológica y los daños provocados por las nanopartículas. Adicionalmente, estas propiedades pueden afectar los resultados de estudios de citotoxicidad o toxicológico, debido a interferencias imprevistas o controles inadecuados. Los investigadores se enfocan a realizar estudios *in vitro* para observar los resultados de toxicidad en organismos, así como los principales problemas y retos para desarrollar ensayos y su validación, en los cuales recomiendan una serie de controles que mejoren la calidad de los experimentos y la seguridad en el uso de nanopartículas en el futuro [1, 2].

En estudios realizados en ambientes experimentales con plantas y bacterias utilizando una pequeña dosis de nanopartículas de plata, se han observado efectos negativos disminuyendo en un tercio la biomasa de estos organismos. La ruta principal por la cual estas partículas entran al medio ambiente es en forma de residuo hacia las plantas de tratamiento de agua, así que éstas y otros materiales terminan en el resultado del tratamiento de aguas residuales, que posteriormente se utilizará como fertilizante en los cultivos. En experimentos *ex situ*, se ha demostrado que las partículas de plata ocasionan efectos tóxicos en microorganismos, donde, a nivel celular desencadenan estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres de oxígeno, afectando gravemente a bacterias benéficas de suelo y agua, lo cual afecta la diversidad de los ecosistemas [1]. Los resultados demuestran que las nanopartículas de plata en los biosólidos, agregadas en concentraciones que se podrían esperar, causan daños estructurales en los ecosistemas. específicamente, las nanopartículas permiten un incremento en flujos de óxido nítrico, cambios en la composición de las comunidades de microbios, su biomasa, y actividad enzimática extracelular, así como efectos específicos de especie sobre la vegetación terrestre.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL.

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas por reducción química de  $\text{AgNO}_3$  y caracterizadas con espectroscopía UV visible y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las microalgas se obtuvieron del lago de Chapala, Jalisco y se mantuvieron en condiciones de laboratorio. Una vez que alcanzaron su crecimiento exponencial (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml), se efectuó el experimento por triplicado durante 24 h con los siguientes tratamientos: control negativo, control con vehículo PVP (polivinilpirrolidona) y tres diferentes concentraciones de nanopartículas de plata: 0.01, 0.1 y 1.0  $\mu\text{g/L}$ . Las muestras permanecieron en condiciones de luz blanca continua y temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , en osciladores orbitales con una velocidad de 120 rpm. Se determinó



la concentración de clorofila a (C<sub>la</sub>) mediante una técnica espectrofotométrica y se realizó un análisis de imágenes en Microscopía electrónica de barrido (SEM) mediante un equipo marca Jeol-JSM-661 OVL. En la caracterización de AgNPs se registró una absorbancia de aproximadamente 420 nm, correspondiendo a la presencia de la plata, así como también un tamaño de partícula del orden de 5-10 nm como se observa en la Figura 1 a y b, respectivamente.

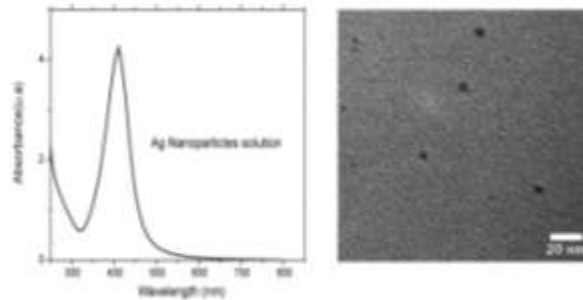


Figura 1. Análisis por Espectroscopía UV visible y TEM de AgNPs.

Para la concentración de C<sub>la</sub>, se observó un fuerte efecto en las muestras con valores de 0.1 y 1 mg/L de AgNPs, alterando la coloración de verde brillante a un café ocre y reduciendo este pigmento significativamente 50 y 95% respectivamente. ( $p \leq 0.05$ ), como se observa en la Figura 2.

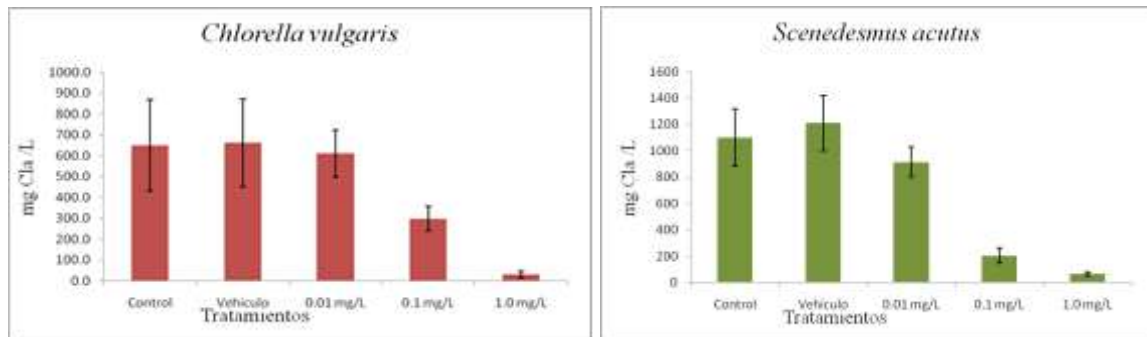


Figura 2. Contenido de Clorofila a en *C. vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, expuestas a varias concentraciones de AgNPs.

Las imágenes SEM, señalan alteraciones en la pared celular de *C. vulgaris*, en los tratamientos con más alta concentración, con invaginaciones en su estructura externa que no se presentaron en los controles (Figura 3).

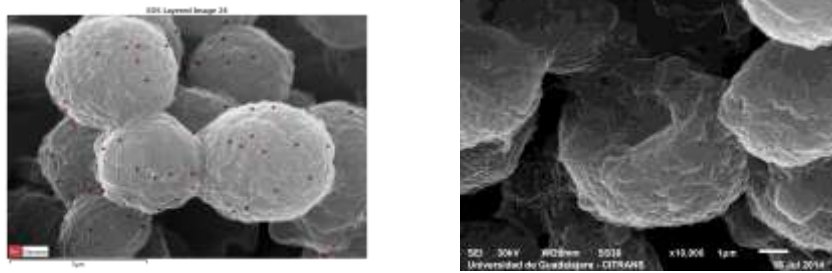


Figura 3. SEM de *C. vulgaris* expuesta a diferentes concentraciones de AgNPs.

Algunos autores [2,4] han señalado alteración de los pigmentos fotosintéticos, provocando un estado de estrés en plantas y algas por diversas condiciones ambientales y presencia de AgNPs, como se ha reportado para *Chlamydomonas reinhardtii*. Las imágenes SEM manifiestan daños dramáticos en la morfología de *C. vulgaris*, como se ha señalado en otros estudios para las clorofitas filamentosas *Pithophora oedogonia* y *Chara vulgaris* [1]. Kanhere, *et al.* (2014) reportaron cambios morfológicos muy similares a los nuestros (perforaciones en la pared celular) al exponer cepas de *Chlorella pyrenoidosa* y *Daphnia magna* al colorante verde malaquita utilizado en la industria alimentaria, e indica que también se presentaron graves alteraciones a nivel genético [5]

#### 4. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que las AgNPs tienen efectos citotóxicos importantes en clorofitas, afectado fuertemente la concentración de clorofila *a* y su morfología y que estas alteraciones pueden tener graves consecuencias a mediano plazo, en la estructura y función de los ecosistemas acuáticos.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Dash, A., Singh, A.P., Chaudahry, B., Singh, S. K. and Dash, D. 2012. Effect of silver nanoparticles on Growth of Eukaryotic green algae. *Nano-Micro Lett.* 4(3): 158-165.
2. Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R. 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. A. Oukarroum *et al.*, *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 78(2012):80-85
3. Lee, S.B. 2011. Nanotoxicology: toxicology and biological effect of nanoparticles for new evaluation standards. *Nanomedicine* 6(5): 759-761.
4. Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* 42, 8959–8964.
5. J. Kanhere & R. Gopinathan & J. Banerjee. (2014). Cytotoxicity and Genotoxicity of Malachite Green on Non-Target Aquatic Organisms: *Chlorella Pyrenoidosa* and *Daphnia Magna*, *Water Air Soil Pollut* (2014) 225:2134