

Nanopartículas de goetita en *Eisenia andrei*: Ingreso, efectos subcelulares y su influencia en la acumulación de Cd y Pb

M. I. Cáceres Wenzel¹, J. Gigena¹, J. S. Fuchs², M. L. Oneto¹, A. C. Cochón¹, N. B. Casabé², N. R. Verrengia Guerrero^{1*}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dpto. de Química Biológica, Toxicología y Química Legal, Argentina.

² IQIBICEN-CONICET

noev@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 05/02/2016 - Aceptado: 22/04/2016

Resumen

El objetivo de este trabajo consistió en investigar la incorporación de nanopartículas (NPs) de goetita (αFeOOH) en la lombriz terrestre *Eisenia andrei* a través de diferentes vías de exposición. En primer lugar, los organismos fueron expuestos a un suelo artificial adicionado con diferentes suspensiones de NPs para evaluar la absorción a través del tracto gastrointestinal. Después de 10 días, los animales fueron depurados y el contenido de Fe se analizó por espectroscopía de absorción atómica (AAS). Sorprendentemente, los animales expuestos a las NPs presentaron niveles de Fe menores que los controles. Además, no se observó una correlación entre los niveles de NPs en las suspensiones y los valores de concentración de Fe en las lombrices. El ingreso por vía dérmica también fue investigado exponiendo a las lombrices en contacto con papeles de filtro que contenían una suspensión de NPs ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) durante diferentes tiempos de exposición aguda (24, 48, y 72 h). En los dos primeros períodos de exposición (24 y 48 h) los niveles de Fe aumentaron con respecto a los que se encontraron en los organismos controles. Sin embargo, después de un período de exposición de 72 h, los niveles en las lombrices expuestas fueron menores que en los controles. De manera de explicar este inesperado comportamiento, se evaluó la capacidad antioxidante total en los tejidos de organismos expuestos a papeles de filtro por 72 h, usando el ensayo de TOSC. Se encontró un descenso significativo en la capacidad antioxidante total en los organismos expuestos. Finalmente, se investigó la influencia de las NPs de goetita en el ingreso de Cd y Pb. En este caso, los bioensayos se realizaron exponiendo a las lombrices a papeles de filtro que contenían una solución de cada metal en presencia o ausencia de una suspensión de NPs ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) por 72 h. Los valores de concentración de Cd y Pb se analizaron por AAS. Tanto para Cd como para Pb se encontraron descensos significativos en la acumulación de ambos metales (aproximadamente 38%) en las lombrices expuestas a cada metal en presencia de la suspensión de NPs de goetita. En conclusión, la liberación de NPs en ecosistemas terrestres puede inducir algunas respuestas inesperadas en las lombrices y

también las NPs pueden interactuar con otros contaminantes preexistentes en el ambiente, modificando su biodisponibilidad.

Palabras clave: *Eisenia andrei*, lombrices terrestres, nano-goetita, nanotoxicidad.

Goethite nanoparticles in *Eisenia andrei*: uptake, subcellular effects and their influence on the accumulation of Cd and Pb

Abstract

The aim of this work was to investigate whether the terrestrial worm *Eisenia andrei* incorporates goethite (αFeOOH) nanoparticles (NPs) via different exposure routes. Firstly, organisms were exposed to an artificial soil spiked with different NP suspensions to evaluate the absorption via the gastrointestinal tract. After 10 days, animals were depurated and their Fe content was analyzed by atomic absorption spectrometry (AAS). Surprisingly, animals exposed to NPs presented lower Fe levels than controls. In addition, a correlation between NP suspension levels and Fe concentrations in the worms was not observed. The dermal uptake route was also investigated by exposing the worms in contact to filter papers containing a NP suspension ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) for different acute exposure times (24, 48, and 72 h). During the first two periods (24 and 48 h) Fe levels increased in relation to those found in control organisms. However, after a 72 h exposure period, levels in exposed worms were lower than in controls. In order to explain this unexpected behavior, the total antioxidant capacity of the whole tissue was evaluated using the TOSC assay in animals exposed to filter papers for 72 h. A significant decrease in the total antioxidant capacity was observed in exposed worms. Finally, the influence of the goethite NPs on the uptake of Cd and Pb was also investigated. In this case, bioassays were performed by exposing worms to filter papers containing a solution of each metal in the presence or in the absence of a NP suspension ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) for 72 h. Values of Cd and Pb concentrations were analyzed by AAS. For both Cd and Pb, significant decreases (about 38%) in the metal accumulation were found in worms exposed to the metal plus the goethite NP suspension. In conclusion, the release of NPs to terrestrial ecosystems may elicit some unexpected responses in worms and they may also interact with other contaminants already present in the environment, modifying their bioavailability.

Keywords: *Eisenia andrei*, terrestrial worms, nano-goethite, nanotoxicity.

Introducción

Los nanomateriales han encontrado aplicación en diferentes campos de la medicina, industria alimenticia, cosmética, pinturas, óptica, textiles, catalizadores, lubricantes, biosensores, electrónica, y agroquímicos [1-5]. La versatilidad de estos materiales es realmente asombrosa ya que incluye desde el desarrollo de vidrios autolimpiantes, parches antimicrobianos para facilitar la cicatrización de heridas y quemaduras, hasta agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas patologías [1,6]. Paralelamente, se están investigando potenciales aplicaciones de los nanomateriales para procesos de remediación de aguas y suelos contaminados [7]. También hay que reconocer que algunas nanopartículas (NPs) tienen un origen natural, tales como ciertos óxidos e hidróxidos de hierro que están presentes en el ambiente y en organismos vivos [8]. Por otra parte, diversos compuestos de hierro en escala nano son sintetizados y utilizados como catalizadores, en sensores, en aplicaciones médicas y más recientemente se ha propuesto su uso en procesos de remediación química, constituyendo así una de las clases comercialmente más importantes de nanomateriales [8-12].

El empleo industrial de los nanomateriales puede conducir a su liberación al medio ambiente ejerciendo un impacto cuyas consecuencias aún no estamos en condiciones de predecir adecuadamente. Debido a sus singulares propiedades físico-químicas, su destino ambiental y los posibles efectos tóxicos en la biota constituyen un desafío que intenta ser resuelto a través de la Nanotoxicología. En principio, se ha propuesto la utilización de las mismas especies de organismos recomendadas como bioindicadoras en los protocolos para los bioensayos clásicos de evaluación de toxicidad de sustancias químicas [13]. Las lombrices terrestres son consideradas excelentes organismos bioindicadores, por su rol en la incorporación y descomposición de materia orgánica que favorece el desarrollo y mantenimiento de la estructura del suelo. Además, son presa importante para muchos organismos superiores y proveen una ruta a través de la cual los contaminantes se transfieren a niveles más altos en la cadena trófica. *Eisenia andrei* es una especie estándar ampliamente usada en ecotoxicología terrestre [14,15]. Dentro de las ventajas que presenta esta especie epigeica está la facilidad con que se puede criar a nivel de laboratorio y el hecho de que existe una extensa base de datos sobre los efectos que en ésta producen numerosas sustancias químicas.

Para evaluar la toxicidad de sustancias químicas en lombrices terrestres existen dos posibilidades de exposición: a) los llamados *ensayos de contacto*, donde las lombrices son expuestas a papeles de filtros impregnados con el agente químico para investigar efectos superficiales, y b) los ensayos de exposición a suelos, que permiten estudiar los efectos derivados de la ingestión así como efectos superficiales.

En el caso de NPs metálicas su incorporación y posible acumulación se puede estimar mediante la cuantificación del metal en los organismos [16-19].

Por otra parte, se considera que uno de los mecanismos más importantes involucrados en la citotoxicidad de los nanomateriales consiste en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) [20,21]. Para hacer frente a la generación de EROs las células disponen de defensas

de carácter enzimático y no-enzimático. El análisis individual de cada una de dichas defensas permite inferir aumentos o descensos que comprometan la homeostasis celular. Sin embargo, una forma más integral de determinar el estado celular redox es mediante el ensayo de la capacidad antioxidante total, el cual permite cuantificar la capacidad de un tejido para neutralizar las EROs [22]. El fundamento de este ensayo reside en cuantificar la capacidad del tejido para neutralizar radicales libres que se generan *in vitro*. Esta técnica ha sido utilizada por diversos autores para evaluar la resistencia frente a EROs en tejidos de organismos expuestos a agentes contaminantes tanto sea en condiciones naturales o mediante ensayos de laboratorio [23].

Una vez que los nanomateriales se liberan al medio ambiente pueden interactuar con las múltiples sustancias químicas, sean de origen natural o antropogénico, preexistentes en el medio. La interacción con otros contaminantes puede producir efectos aún más inciertos. Los elementos Cd y Pb son metales que pueden alcanzar los suelos a partir de diversas fuentes de emisión.

En consecuencia, los objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar la incorporación de NPs de goetita (αFeOOH) en *E. andrei* expuestos ya sea a suelo artificial o a papeles de filtro; 2) investigar la capacidad antioxidante total en lombrices expuestas a NPs de goetita; 3) evaluar el rol de estas nanopartículas en el ingreso de otros metales tóxicos, específicamente Cd y Pb.

Materiales y métodos

Materiales

Se trabajó con una suspensión conteniendo 20% de NPs de goetita de origen comercial (número de producto: 720704, Sigma-Aldrich, Argentina). Según especificaciones del fabricante el rango nominal de tamaño de partícula es menor a 100 nm y el pH de la suspensión se encuentra en el rango de 3,4-4,0. Estas especificaciones fueron confirmadas previamente [24].

Para los bioensayos, las suspensiones se prepararon en agua bidestilada, sonicando la suspensión madre por 30 min.

Los compuestos 2,2'-azobisaminopropano (ABAP) y ácido α -ceto- γ -metilbutírico (KMBA) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, Argentina S.A. Todos los otros reactivos eran de calidad pureza analítica o superior.

Organismo de estudio: Eisenia andrei

Los ejemplares de *E. andrei* fueron cultivados en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura, humedad y pH [25, 26]. Se seleccionaron ejemplares adultos, con al menos 2 meses de edad, con clitelo desarrollado y un peso húmedo comprendido entre 300-600 mg. Como son hermafroditas, no se requiere tener en cuenta diferencias sexuales.

Bioensayos de exposición

Antes de comenzar los bioensayos, las lombrices fueron lavadas con agua potable de clorada y colocados sobre papeles de filtro húmedos por un mínimo de 12 h para evacuar el contenido intestinal.

Para investigar la incorporación de NPs en *E. andrei* por las vías de ingestión más contacto superficial, los organismos se expusieron a un suelo artificial, al cual se le adicionaron distintas suspensiones de nano-goetita de manera que la concentración final resultara igual a 10; 100 y 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$, peso seco. Se utilizaron potes de 500 mL conteniendo 400 g de suelo artificial adicionado con las NPs y se dispusieron dos organismos por pote. Por cada nivel de NPs, los bioensayos se realizaron por triplicado. El tiempo de exposición fue de 10 días.

El suelo artificial fue preparado según métodos estandarizados por la OECD [27]. Básicamente, su composición consistía en 70% (p/p) de arena industrial de cuarzo (con más del 50 % en peso del tamaño de partícula 0,05-0,2 mm), 20% (p/p) de caolín (conteniendo no menos del 30 % de arcilla coloidal de caolinita), 10% turba de sphagnum, sin remanente de plantas visible. A esta mezcla se agregó 0,3-1% (p/p) de CaCO_3 grado analítico, pulverizado, hasta obtener un pH inicial de $6,0 \pm 0,5$.

Las suspensiones de NPs fueron realizadas en agua deionizada y sonicadas por 30 min. Al comienzo de los bioensayos, el contenido de humedad se ajustó al 40-60 % de la capacidad de retención acuosa y se adicionaron las suspensiones de NPs. Durante los ensayos, el contenido de humedad del suelo se mantuvo constante mediante el agregado de agua destilada. Los bioensayos se realizaron bajo ciclos controlados de luz-oscuridad (16h/8h), a 22 ± 2 °C. Los organismos controles fueron expuestos al suelo artificial humedecido sólo con agua deionizada.

Para los bioensayos que evalúan efectos por contacto los organismos fueron expuestos a papeles de filtro (superficie = 60 cm^2) impregnados con una suspensión de $50 \mu\text{g NP cm}^{-2}$, siguiendo protocolos estandarizados [28]. Los papeles fueron secados bajo campana y dispuestos en viales. Se colocó una lombriz por vial adicionando 1 mL de agua destilada para mantener la humedad. Para evaluar los efectos de las NPs sobre los organismos, se realizaron análisis de Fe en lombrices expuestas a distintos tiempos, $t = 24, 48$ y 72 h.

Para evaluar los efectos de las NPs sobre la incorporación de Cd y Pb, los papeles de filtro fueron expuestos primeramente a 1 mL de soluciones equimolares de Cd o Pb ($0,40 \mu\text{g Cd cm}^{-2}$ y $0,74 \mu\text{g Pb cm}^{-2}$), dejados secar bajo campana y luego se adicionó 1 mL de una suspensión conteniendo $50 \mu\text{g NP cm}^{-2}$. Las diluciones de Cd se prepararon a partir de una solución conteniendo 1.000 mg L^{-1} usando $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2} \text{ H}_2\text{O}$ en agua bidestilada. En forma análoga, las diluciones de Pb se prepararon a partir de una solución conteniendo $1.000 \text{ mg Pb L}^{-1}$ usando $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en agua bidestilada.

Se realizaron 6 réplicas para cada determinación (análisis de metales y determinaciones de parámetros biomarcadores).

Al término de los bioensayos, los organismos fueron retirados cuidadosamente del medio de exposición y enjuagados tres veces con abundante agua destilada. Las lombrices que provenían de los bioensayos en suelo artificial fueron transferidas individualmente a viales que contenían papeles de filtro embebidos con 1 mL de agua destilada durante 12 h para proceder a la purga del contenido intestinal. Las lombrices que fueron expuestas por contacto se procesaron después de los enjuagues. Cada lombriz fue pesada y el tejido blando total se destinó al análisis de metales o al ensayo de capacidad antioxidante total.

Análisis de metales

Para proceder a los análisis de metales, cada lombriz fue colocada individualmente en tubos de vidrio de borosilicato de 25 mL de capacidad conteniendo aprox. 5 mL de HNO₃ concentrado por g de tejido y digerida durante unas 8 h a T = 100 °C para proceder a la destrucción de la materia orgánica. Terminado este proceso, el residuo fue filtrado por papel de filtro y transferido a un tubo graduado. El volumen final fue llevado a 5 mL con solución de HNO₃ 1 %. Las diluciones se analizaron por espectrometría de absorción atómica, en un equipo 575 AA Varian, utilizando una llama de aire-acetileno y una lámpara de deuterio para corregir el ruido de fondo. Los valores de concentración de metales fueron expresados en microgramos de metal por gramo (tejido húmedo). Los límites de detección fueron iguales a 0,10 µg Fe g⁻¹; 0,2 µg Cd g⁻¹; y 0,5 µg Pb g⁻¹. Los valores de los blancos de reactivos se encontraron siempre por debajo de los límites de detección.

Todo el material de vidrio fue prelavado con una mezcla conteniendo 5% de ácido nítrico (v/v) y 5% de ácido clorhídrico (v/v) por 25 h y luego enjuagado con abundante agua bidestilada.

Capacidad antioxidante total (ensayo de TOSC)

Para el ensayo de TOSC se siguió básicamente el procedimiento descrito por Regoli y Winston [29]. Los homogenatos fueron preparados en una solución tampón de Tris-HCl 100 mM a pH = 7,5, y se centrifugaron a 9000 x g por 30 min a 4 °C. El precipitado fue descartado y se utilizaron los sobrenadantes. Los radicales peroxilos se generaron a partir de la homólisis térmica del ABAP, el cual produce la oxidación del KMBA para generar etileno. El etileno se analizó utilizando la técnica de espacio-cabeza en un equipo de cromatografía gaseosa. Las reacciones se efectuaron en viales sellados en un volumen final de 1,0 mL. La mezcla de reacción contenía 20 mM ABAP; 0,2 mM KMBA; 0,1 mM de solución tampón de fosfato a pH 7,4, y una alícuota del sobrenadante del homogenato. La reacción fue iniciada mediante la inyección del ABAP en los viales, los cuales fueron inmediatamente incubados a 35 °C. La producción de etileno fue seguida tomando con una jeringa una alícuota de 1,0 mL de la fase gaseosa la cual fue inyectada en un cromatógrafo gaseoso (Agilent 6890N GC, CA, USA) equipado con una columna Q-Plot (30 m de largo y 0,53 mm de diámetro interno, marca Supelco), utilizando un detector de ionización de llama.

Las temperaturas del horno, del inyector y del detector fueron 35, 180 y 250 °C, respectivamente. Como gas transportador se usó nitrógeno a un flujo de 4,7 mL min⁻¹. La formación de etileno fue cuantificada como el área bajo la curva cinética.

Los valores de TOSC fueron cuantificados a partir de la ecuación: $TOSC = 100 - (AM/AC \times 100)$, donde AM y AC eran las áreas de las curvas que mejor se ajustaban a los puntos experimentales durante el curso de la reacción para la muestra (AM) y el control (AC), respectivamente.

Un valor de TOSC = 0 indica que la muestra no exhibe ninguna capacidad antioxidante, de manera que la formación de etileno resulta máxima, o sea que $AM/AC = 1$. Por el contrario, un valor de TOSC = 1 indicaría que la muestra tiene la capacidad para inhibir completamente la formación de etileno ($AM/AC=0$).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm D.E. (desviación estándar). Los distintos tratamientos se analizaron utilizando ANOVA de un factor y las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la prueba de Tukey, con el software OriginPro 7.5 (OriginLab, Northampton, MA). Se utilizó un nivel de significación de 0,05. Previamente al ANOVA, los datos fueron evaluados para normalidad y homogeneidad de la varianza.

Resultados

Ingreso de nano-goetita en *E. andrei*

Los valores de concentración de Fe en lombrices expuestas a distintos niveles de suspensiones de NPs en suelo artificial durante 10 días se presentan en la Fig. 1.

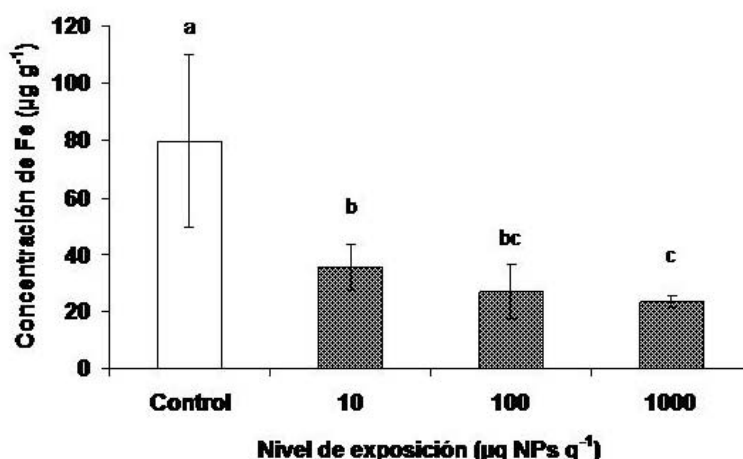


Fig. 1. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* expuestas a distintas suspensiones de NPs de goetita en suelo artificial durante 10 días. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el valor medio \pm la desviación estándar de 6 lombrices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

Con respecto a los organismos controles, los niveles de Fe en *E. andrei* expuestos a las distintas suspensiones de goetita resultaron significativamente menores ($p < 0,05$). La menor concentración de Fe se observó en los ejemplares expuestos a las dos mayores suspensiones de NPs.

Seguidamente se realizó un ensayo utilizando papel como medio soporte, exponiendo a los organismos a un único nivel de nano-goetita en forma aguda para analizar los valores de Fe a través del tiempo (Fig. 2). En este caso se encontró que los niveles de Fe aumentaron significativamente durante las primeras 24 y 48 h ($p < 0,05$) para luego descender significativamente una vez transcurridas 72 h de exposición. En organismos controles, los niveles de Fe no presentaron cambios significativos durante el tiempo de análisis ($p > 0,05$).

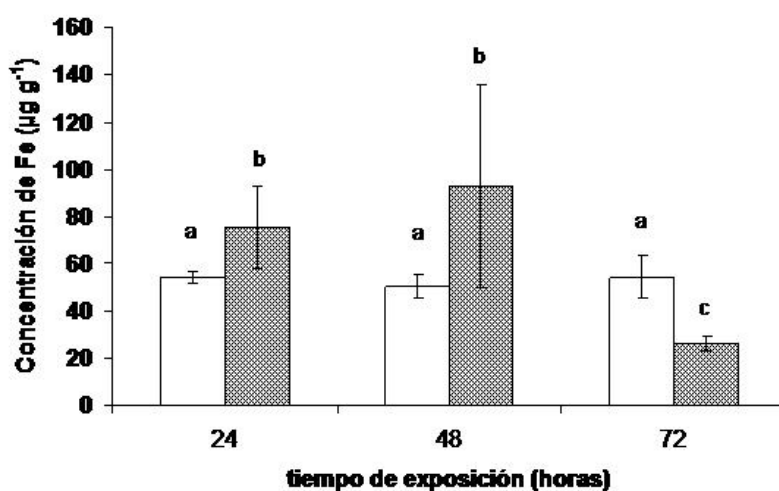


Fig. 2. Valores de concentración de Fe en lombrices *E. andrei* expuestas por distintos tiempos a una suspensión de NPs de goetita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) en papel. Los resultados se expresan en $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ de tejido (peso húmedo) y representan el valor medio \pm la desviación estándar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

Ensayo de capacidad antioxidante total (TOSC)

Los valores resultantes del ensayo de TOSC se presentan en la Fig.3. En comparación con los organismos controles, se puede observar un significativo descenso en la capacidad antioxidante total de aquellos organismos expuestos por 72 h a papeles de filtro conteniendo una suspensión de NPs de goetita igual a $50 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($p < 0,05$).

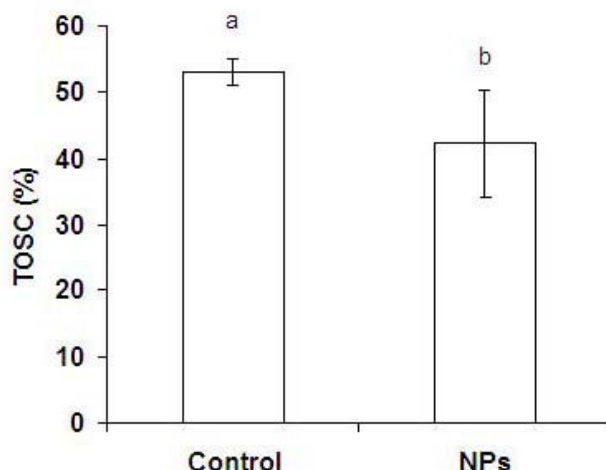


Fig. 3. Valores del ensayo de TOSC en lombrices *E. andrei* expuestas por 72 h a una suspensión de NPs de goetita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) en papel. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al control de reacción (sin tejido) y representan el valor medio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por nivel. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Influencia de nano-goetita en la acumulación de Cd y Pb

En las Fig. 4 A y B se muestran los niveles de Cd y de Pb, respectivamente, en lombrices expuestas por 72 h en forma separada a soluciones equimoleculares de Cd o Pb en presencia o ausencia de una suspensión conteniendo $50 \mu\text{g NP cm}^{-2}$ utilizando papel como medio soporte. Los valores de Cd y Pb en lombrices controles no se incluyen ya que se encontraron siempre por debajo del límite de detección.

Frente a ambos metales se observaron descensos significativos por efecto de este nanomaterial, que alcanzaron el 34 % en el contenido de Cd y el 38 % en el de Pb.

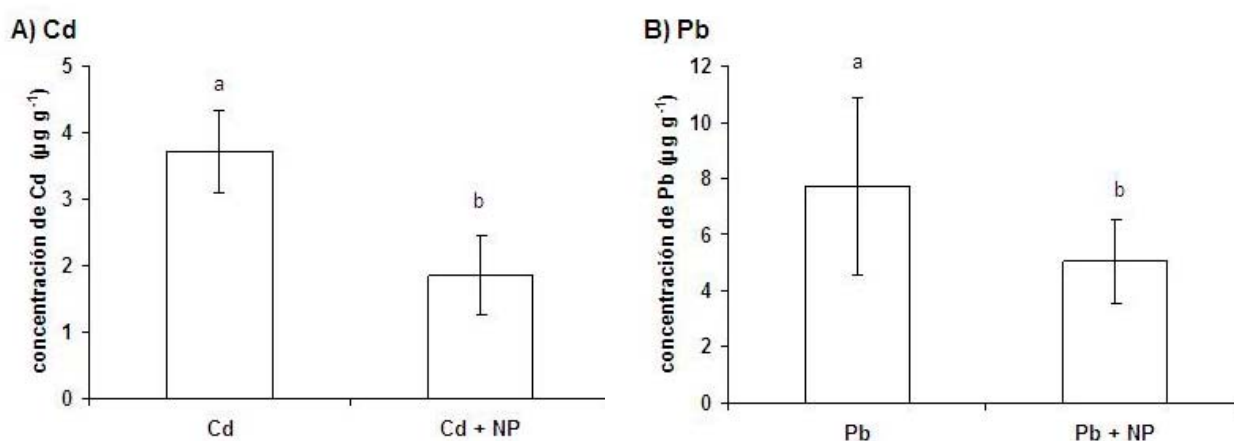


Fig. 4. Valores de concentración de A: Cadmio y B: Plomo en lombrices *E. andrei* expuestas en forma separada a cada metal en presencia y ausencia de una suspensión conteniendo NPs de goetita ($50 \mu\text{g NPs cm}^{-2}$) en papel. Los resultados se expresan en μg de cada metal por g de tejido (peso húmedo) y representan el valor medio \pm la desviación estándar de 6 lombrices por nivel. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Discusión

El ingreso de las nanopartículas de goetita en *E. andrei* se investigó mediante análisis de Fe como parámetro indicador de exposición. Es necesario reconocer que hasta el momento, no se dispone de metodologías suficientemente eficaces como para cuantificar a las NPs con exactitud [30]. Por esta razón cuando se utilizan NPs de metales y/o de sus óxidos u oxihidróxidos, los análisis del contenido de dichos elementos constituyen una aproximación ampliamente empleada [16-19].

Para este estudio se emplearon dos tipos de medio soporte para realizar los bioensayos. En un caso se recurrió a un medio estandarizado constituido por suelo artificial, donde las lombrices fueron expuestas por un período de 10 días a distintos niveles de suspensiones de NPs.

Contrariamente a lo esperado, los niveles de Fe presentes en los organismos expuestos resultaron siempre menores a los niveles basales encontrados en los organismos controles. Por otra parte, no se observó una clara correlación entre los niveles de Fe detectados en los organismos con los niveles de exposición, ya que entre las dos concentraciones más bajas de exposición (10 y 100 $\mu\text{g NPs g}^{-1}$ suelo) y las dos más altas (100 y 1000 $\mu\text{g NPs g}^{-1}$ suelo) no se observaron diferencias significativas entre sí. Si bien las normas recomiendan un período de exposición mayor para evaluar toxicidad mediante estudios de exposición subcrónica (28 días) [31], se prefirió limitar estos bioensayos a 10 días de exposición. Frente a tiempos mayores se observó una marcada disminución en el peso de los ejemplares y un descenso significativo en el contenido basal de Fe en organismos controles que disminuía a un valor igual a 44,6 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ (representando aproximadamente un 56% respecto del valor basal tras 10 días de exposición) (datos no mostrados). Es indudable que el uso de suelo artificial asegura una mayor pureza y homogeneidad de sus componentes, y fundamentalmente presenta una mayor relevancia ecotoxicológica. Sin embargo, carece de los nutrientes en calidad y cantidad suficiente como para mantener un estado de salud óptimo de los organismos durante períodos prolongados. Por esta razón, se prefirió efectuar los bioensayos durante períodos más cortos.

Los ensayos que se realizan empleando papeles de filtro impregnados con las sustancias cuya toxicidad se pretende determinar, constituyen una alternativa avalada desde hace tiempo por organismos internacionales [28]. Dichos bioensayos permiten evaluar el ingreso de sustancias químicas por contacto, o sea por vía dérmica. Esta ruta de exposición puede desempeñar un rol importante para el ingreso de diversos metales en lombrices terrestres [32, 33]. En cambio, los bioensayos que recurren al uso de suelo artificial además de considerar la posibilidad de ingreso por contacto, permiten evaluar fundamentalmente la incorporación por ingestión. En los ensayos por contacto la normativa recomienda efectuar las exposiciones en forma aguda por un período de 48 horas, y eventualmente de hasta 72 h ya que al usar papel como medio soporte los organismos carecen completamente de la disponibilidad de cualquier tipo de nutrientes. Para estos bioensayos se decidió fijar un nivel subletal de exposición (50 $\mu\text{g NPs cm}^{-2}$) y cuantificar los niveles de Fe cada 24 h. Inicialmente, tras 24 y 48 h de exposición, se

observó un incremento significativo respecto a los valores basales presentes en organismos controles. Sin embargo, tras 72 h de exposición se registró un marcado descenso en los valores de Fe en *E. andrei*. Por un lado, estos resultados demuestran que durante las primeras 48 h, las lombrices fueron capaces de incorporar a las NPs. Además, con esta técnica se podría descartar que dichos incrementos en el contenido de Fe observados en los dos primeros tiempos de exposición fueran debidos a la presencia transitoria de NPs en el tracto gastrointestinal de los organismos ya que la vía de ingestión no está disponible. Sin embargo, el descenso de los niveles de Fe observado tras 72 h de exposición en los bioensayos utilizando papeles de filtro impregnados en conjunto con los descensos registrados en los bioensayos en los cuales se empleó suelo artificial no son fáciles de explicar. Podría sugerirse que más allá de que las lombrices estén expuestas a las NPs por ingestión o por vía dérmica, se podría verificar el primer proceso de la toxicocinética o sea que estaríamos en presencia de una verdadera absorción. Como consecuencia de esta absorción, se desencadenaría una serie de efectos sistémicos que conducirían a la excreción de una parte de los niveles basales de Fe. Dicha excreción podría tener lugar incluso a suspensiones de NPs aún menores a las ensayadas en los experimentos con suelo artificial, por cuanto de acuerdo a la Fig. 1 no se encontró una buena correlación entre el contenido de Fe y la concentración de nano-goetita.

Esta hipótesis, si bien arriesgada, parece plausible cuando se analizan los resultados de los ensayos de la capacidad antioxidante total en organismos expuestos a papeles de filtro. Al nivel analizado, tras una exposición por 72 h se observó una significativa disminución respecto a los valores de organismos controles. El ensayo de la capacidad antioxidante permite estimar en forma integral el nivel de las defensas de un tejido u organismo, sean de carácter enzimático como no enzimático. Un descenso en los valores refleja que ese tejido u organismo está sujeto a un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, de manera que se encuentra más susceptible para sufrir procesos de estrés oxidativo. Además, estos cambios en la capacidad antioxidante apoyan la teoría de que el mecanismo de acción de las NPs, y en particular de las de goetita, se verifica por alteraciones en la homeostasis celular redox.

Frente a los descensos encontrados en los niveles de Fe en organismos expuestos a las NPs de goetita cabría preguntarse si el mismo efecto podría observarse en lombrices expuestas a no-nano goetita (o macro goetita). Sin embargo, los óxidos y oxihidróxidos de Fe son prácticamente insolubles a valores de pH fisiológicos. Por consiguiente, en escala macro, es de esperar que su incorporación en los organismos sea despreciable, dado que el ingreso de iones metálicos se verifica fundamentalmente a través de las especies iónicas disueltas [32]. De hecho, aún frente a exposiciones crónicas a suelos con distintos niveles de contaminación de Fe, no se observaron cambios en el contenido corporal de dicho metal en lombrices terrestres [34]. En nuestro laboratorio se efectuaron bioensayos con lombrices *E. andrei* expuestas a papeles de filtro impregnados con no-nano Fe_2O_3 ($50 \mu\text{g cm}^{-2}$) por 72 h. El contenido de Fe en los organismos expuestos ($52,20 \pm 5,34 \mu\text{g g}^{-1}$) no difirió significativamente respecto al registrado en los ejemplares controles ($53,72 \pm 9,41 \mu\text{g g}^{-1}$). No obstante, hay muy pocos estudios en la literatura que hayan contemplado estos aspectos, de manera que se

planea investigar el ingreso de macro goetita en *E. andrei* empleando las mismas condiciones experimentales.

Finalmente, se determinó la influencia de las NPs de goetita en la incorporación de otros metales tóxicos, en particular de Cd y Pb, frecuentes contaminantes en sistemas acuáticos y terrestres, no sólo por sus aplicaciones en la industria metalúrgica. En suelos, la contaminación por Cd puede derivarse también del uso de fertilizantes a base de fosfatos que naturalmente estén contaminados con el elemento o por el descarte de baterías de Cd-Ni sin tratamiento [35, 36]. Este metal se caracteriza por su elevada toxicidad y alto potencial de acumulación en la biota [36]. Por su parte, la presencia de Pb puede ser consecuencia del rellenado de suelos con residuos contaminados (uso de lodos y/o sedimentos provenientes del dragado de ríos), de la liberación de desechos de baterías [37] e incluso de residuos de disparos de armas de fuego [38].

Los resultados de los bioensayos de exposición a dichos metales indican que efectivamente los organismos de la especie *E. andrei* son capaces de incorporar cantidades apreciables de ambos elementos por vía dérmica. En presencia simultánea de NPs, se observaron descensos comparables para ambos metales (34 % en el ingreso de Cd y 38 % en el de Pb) frente a concentraciones equimoleculares de exposición.

Debido a su particular estructura, caracterizada por una gran área superficial y los grupos funcionales (hidroxilos) presentes en los sitios activos superficiales, la goetita, ya sea en escala nano como macro, exhibe un alto potencial como adsorbente de sustancias químicas, incluyendo cationes de metales contaminantes [39, 40]. No obstante, esta adsorción depende en gran medida de factores tales como el pH, la fuerza iónica, el contenido de materia orgánica del suelo; la temperatura del medio; la concentración de los metales que pueden adsorberse; la presencia de otros iones que puedan competir por los sitios de unión; los efectos de envejecimiento, por citar los más relevantes [12, 41, 42]. Por otra parte, no debe olvidarse que esos mismos factores pueden afectar el estado de agregación de las NPs así como sus cargas superficiales [43]. La mayoría de los estudios encarados hasta el momento se han dedicado a investigar los potenciales mecanismos y las variables que pueden influir en los procesos de adsorción-desorción entre goetita y metales, sin considerar los efectos sobre especies biológicas. Algunos estudios señalan que la adsorción de Pb sería mayor que la Cd [40]. Sin embargo, nuestros resultados reflejan que la biodisponibilidad de ambos metales disminuye en forma comparable para *E. andrei*. Por otra parte, también se ha demostrado que algunas NPs pueden facilitar el ingreso de metales contaminantes en la biota [44, 45]. Es indudable que aún es necesario encarar más estudios, especialmente de índole interdisciplinaria, para esclarecer la biodisponibilidad de sustancias contaminantes en presencia simultánea de nanomateriales.

Conclusiones

La exposición de lombrices terrestres de la especie *E. andrei* ya sea por ingestión o por contacto dérmico a NPs de goetita puede promover con el tiempo a una disminución en los

niveles basales de Fe. Cuando esto ocurre, la capacidad antioxidante total de los organismos disminuye significativamente, hecho que puede conducir a una mayor sensibilidad frente a la generación de EROs. Por otra parte, estas NPs exhibieron una capacidad para interactuar con otros contaminantes, tales como Cd y Pb, promoviendo un menor ingreso de ambos metales. Frente a estos resultados se comprende que aún resta un largo camino para esclarecer los efectos tóxicos de los nanomateriales y las complejas interacciones que pueden verificarse con otros contaminantes preexistentes en el ambiente.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento recibido de las siguientes instituciones: ANPCYT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) PICT 2010-00544; CONICET (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) PIP 00357, y Universidad de Buenos Aires Q454. M.I. Caceres Wenzel se desempeñó con una beca de la ANPCYT.

Referencias

1. **Dowling AP** (2004) Development of nanotechnologies. *Nanotoday* 30-35.
2. **Handy RD, Henry TB, Scown TM, Johnston BD, Tyler CR** (2008) Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology* 17: 396-409.
3. **Kahru A, Dubourguier HC** (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 269: 105-119.
4. **Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, Schuster EW** (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Protection* 35: 64-70.
5. **Rivero PJ, Urrutia A, Goicoechea J, Arregui FJ** (2015) Nanomaterials for functional textiles and fibers. *Nanoscale Research Letters* 10: 501-523.
6. **Sanvincens N, Marco MP** (2008) Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology* 26: 425-435.
7. **Vunain E, Mishra AK, Mamba BB** (2016) Dendrimers, mesoporous silicas and chitosan-based nanosorbents for the removal of heavy metal ions: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.005>.
8. **Chernyshova IV, Ponnurangam S, Somasundaran P** (2011) Effect of nanosize on catalytic properties of ferric (hydr)oxides in water: Mechanistic insights. *Journal of Catalysis* 282: 25-34.
9. **Cross KM, Lu Y, Zheng T, Zhan J, Mc Pherson G, John V** (2010) Water decontamination using iron and iron oxides nanoparticles. In *Nanotechnology Applications for Clean Water*. New York: William Andrew Inc.
10. **Parveen S, Misra R, Sahoo SK** (2012) Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnosis and imaging. *Nanomedicine Nanotechnology* 8: 147-166.
11. **Zhu X, Tian S, Cai Z** (2012) Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Plos one* 7: e46286.
12. **Liu H, Chen T, Frost RL** (2014) An overview of the role of goethite surfaces in the environment. *Chemosphere* 103: 1-11.
13. **OECD: Organization of Economic Cooperation and Development** (2014) Ecotoxicology and environmental fate of manufactured nanomaterials: Test Guidelines, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials N° 40. Paris, France.

14. **ISO: International Organization for Standardization** (1993) ISO 11268-1, "Soil quality- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: determination of acute toxicity using artificial soil substrate", Genève, Switzerland.
15. **Shepard S, Bembridge J, Holmstrup M, Posthuma L** (1998) Advances in Earthworm Ecotoxicology, Society of Environmental Toxicology and Chemistry-SETAC Press.
16. **Croteau MN, Misra SK, Luoma SN, 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: 6600-6607.
17. **Hu J, Wang D, Wang J, Wang J** (2012) Bioaccumulation of Fe₂O₃ (magnetic) nanoparticles in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution* 162: 216-222.
18. **Jo HJ, Choi JW, Lee SH, Hong SW** (2012). Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. *Journal of Hazardous Materials* 227-228: 301-308.
19. **Ates M, Arslan Z, Demir V, Daniels J, Farah IO** (2015) Accumulation and toxicity of CuO and ZnO nanoparticles through waterborne and dietary exposure of goldfish (*Carassius auratus*). *Environ Toxicol* 30: 119-128.
20. **Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro JM, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K** (2011) Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6: 446-465.
21. **Baker TJ, Tyler CR, Galloway TS** (2014) Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution* 186: 257-271.
22. **Winston GA, Lemaire DGE, Lee RF** (2004) Antioxidants and total oxyradical scavenging capacity during grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryogenesis. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 139: 281-288.
23. **Abele D, Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T** (eds) (2012) *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. Wiley-Blackwell.
24. **Gigena J, Martínez ML, Zbihlei G, Bozzano P, Alonso PR, Cochón AC, Verrengia Guerrero NR** (2016). Investigating the uptake and some subcellular effects of manufactured goethite nanoparticles on *Lumbriculus variegatus*. *Expert Opinion on Environmental Biology*, en prensa.
25. **Casabé N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Giménez R, Massaro R, Papa JC, Kesten E** (2007) Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils & Sediments* 7: 232-239.
26. **Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Basack S, Kesten E, Casabe N** (2013) Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere* 91: 545–551.
27. **OECD: Organization of Economic Cooperation and Development** (2004) Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Guideline for testing chemicals N° 222. Test (*Eisenia fetida/andrei*). Paris, France.
28. **OECD: Organization for Economic Cooperation and Development** (1984) Earthworm acute toxicity tests, N° 207, In OECD Guideline for testing of Chemicals, OECD, Paris, France.
29. **Regoli F, Winston GW** (1999) Quantification of total oxidant scavenging capacity (TOSC) of antioxidants for peroxyxynitrite, peroxy radicals and hydroxyl radicals. *Toxicology & Applied Pharmacology* 156: 96-105.
30. **Handy RD, van den Brink N, Chappell M, Mühlhling M, Behra R, Dusinská M, Simpson P, Ahtainen J, Jha AN, Seiter J, Bednar A, Kennedy A, Fernandes TF, Riediker M** (2012) Practical

considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? *Ecotoxicology* 21: 933-972.

31. **US EPA: United States Environmental Protection Agency** (2012) OCSPP 850.3100: Earthworm Subchronic Toxicity Test. EPA 712-C-016.
32. **Peijnenburg W, Baerselman R, de Groot A, Jager T, Posthuma L, Van Veen R** (1999) Relating environmental availability to bioavailability soil-type-dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 294-310.
33. **Vijver MG, Vink JPM, Miermans CJH, van Gestel CAM** (2003) Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 125-132.
34. **Bernard F, Brulle F, Douay F, Lemièrre S, Demuyneck S, Vandebulcke F** (2010) Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1034-1045.
35. **Syers JK, Cisse L** (2000) Regional differences in the inputs of cadmium to soils. In: SCOPE, et al. (Eds.), Environmental Cd in the Food Chain: Sources, Pathways, and Risks. SCOPE, Brussels, Belgium.
36. **UNEP: United Nations Environment Programme** (2008a). Interim review of scientific information on cadmium,
37. **UNEP: United Nations Environment Programme** (2008b). Interim review of scientific information on lead.
38. **Luo W, Verweij RA, van Gestel CAM** (2014) Determining the bioavailability and toxicity of lead contamination to earthworms requires using a combination of physicochemical and biological methods. *Environmental Pollution* 185: 1-9.
39. **Plathe KL, von der Kammer F, Hassellöv M, Moore JN, Murayama M, Hofmann T, Hochella Jr. MF** (2013) The role of nanominerals and mineral nanoparticles in the transport of toxic trace metals: Field-flow fractionation and analytical TEM analyses after nanoparticle isolation and density separation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 102: 213-225.
40. **Liu Y, Tourbin M, Lachaize S, Guiraud P** (2014) Nanoparticles in wastewaters: Hazards, fate and remediation. *Powder Technology* 255: 149-156.
41. **Mustafa G, Singh B, Kookana RS** (2004) Cadmium adsorption and desorption behaviour on goethite at low equilibrium concentrations: effects of pH and index cations. *Chemosphere* 57: 1325-1333.
42. **Orsetti S, Quiroga MM, Andrade EA** (2006) Binding of Pb(II) in the system humic acid/goethite at acidic pH. *Chemosphere* 65: 2313-2321.
43. **Xu CY, Deng KY, Li JY, Xu RK** (2015) Impact of environmental conditions on aggregation kinetics of hematite and goethite nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 17: 394.
44. **Zhang X, Sun H, Zhang Z, Niu Q, Chen Y, Crittenden JC** (2007) Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere* 67: 160-166.
45. **Hartmann N B, Legros S, Von der Kammer F, Hofmann T, Baun A** (2012) The potential of TiO₂ nanoparticles as carriers for cadmium uptake in *Lumbricus variegatus* and *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 118-119: 1-8.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 2, Año 15, Agosto 2016

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

