



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

CENTRO DE NANOCIENCIAS  
Y NANOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE  
NANOMATERIALES DE INTERÉS BIOMÉDICO EN  
MICROALGAS

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA  
PRESENTA  
ANDREA CAZARES MORALES

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO VAZQUEZ-MUÑOZ  
DRA. BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL

ENSENADA BAJA CALIFORNIA A DICIEMBRE 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

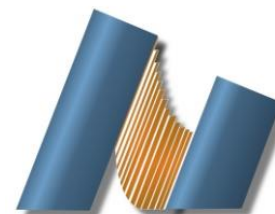
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

**LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA  
BIONANOTECNOLOGÍA**



**EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE NANOMATERIALES DE INTERÉS BIOMÉDICO EN MICROALGAS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**ANDREA CÁZARES MORALES**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. ROBERTO VAZQUEZ MUÑOZ**

**DRA. BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA DICIEMBRE 2018**

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

---

*Andrea Cázares Morales*

Resumen de la tesis que presenta **Andrea Cázares Morales** para la obtención del título de Licenciado en Nanotecnología.

## EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE NANOMATERIALES DE INTERÉS BIOMÉDICO EN MICROALGAS

Los nanomateriales tienen propiedades distintas a los materiales en bulto, lo que les permite ser usados en una amplia cantidad de campos y aplicaciones. Una de estas áreas es la biomedicina, en la cual pueden ser empleados como tratamientos, métodos de detección y mecanismos de liberación de fármacos. Los nanomateriales de interés biomédico (NIB) son diseñados para no ser tóxicos para lo humanos, pero muy poca investigación existe sobre cómo podrían llegar a interactuar con el ambiente una vez que sean desechados. Uno de los probables escenarios es que los NIB terminen en ecosistemas marinos, donde las microalgas juegan un papel esencial como base de las redes tróficas. Conocer los efectos tóxicos que los NIB pueden tener en las microalgas puede ayudar a prevenirlos. En el presente estudio se analizaron  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ : Er/Yb, YAG: Pr, y Zeolita: Ag a 1, 10 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en tres especies de microalgas marinas: *Dunaliella* sp, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*. Los NIB fueron caracterizados por dispersión de la luz dinámica (DLS) al estar suspendidos en medio de cultivo para estudiar su estabilidad. Además, se analizaron los efectos de los NIB en el crecimiento, fisiología (daño al material genético y por estrés oxidante) y ultraestructura. Se encontró que los NIB son inestables en medio de cultivo, lo que los vuelve propensos a agregarse y precipitarse. La Zeolita: Ag, resultó ser el nanomaterial evaluado más tóxico, mientras que  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ : Er/Yb y YAG: Pr, generan respuestas menos severas y los efectos provocados por estos tratamientos son similares. *Dunaliella* sp e *I. galbana* son más resistentes a los NIB que *C. muelleri*, lo cual puede deberse a que las diatomeas, al ser más pequeñas, tienen mayor proporción área-superficie, lo que aumenta la velocidad a la que incorporan partículas del medio.

Palabras clave: *nanotoxicología ambiental, microalgas marinas, nanopartículas de tierras raras.*

## Dedicatorias

*A Alfredo, Silvia y Mariana*

## Agradecimientos

A la UNAM, por permitirme formar parte del programa de licenciatura, por darme el conocimiento y las herramientas para formarme profesionalmente, así como por las becas y oportunidades de estancias que me ayudaron a seguir creciendo como persona. A mis profesores, por la guía y enseñanza que me ayudaron a convertirme en científica. Al CNYN y CICESE, por el apoyo en las instalaciones y equipos que me permitieron desarrollar mi proyecto, el cual concluye en el presente trabajo.

A mis directores y comité de tesis, por su apoyo, paciencia y tiempo brindados durante mi trabajo de tesis. Al Dr. Roberto Vazquez Muñoz, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él durante los últimos cuatro años, por posibilidad de enseñar a otros, y por su amistad. A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por permitirme trabajar en su laboratorio y con su grupo, por sus conocimientos y tutela sobre microalgas. Al Dr. Alejandro Huerta Saquero, por haberme recibido en su equipo y por todo el apoyo brindado al proyecto.

A investigadores y técnicos. Al Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores, por proporcionar los nanomateriales con los que se realizó este trabajo. Al Dr. Rubén Darío Cadena Nava, por su apoyo para el manejo y uso del DLS. A la M. C. Elizabeth Soria Castro, por su apoyo en el TEM del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología. A Abelardo Campos Espinoza, por su apoyo con el equipo y asesoramiento en el Departamento de Acuicultura. A la Dra. Katrin Quester, por su apoyo técnico en el Departamento de Bionanotecnología.

A mi familia y amigos. A mis padres, por su apoyo incondicional, por creer siempre en mí y por alentarme en mis momentos de duda. A mi hermana, Mariana, por sus revisiones y correcciones a este trabajo. A José, César, Rubén, Ricardo, Julián y Carlos, por su amistad y consejos. A Brenda y Brian, por convencerme de que era posible terminar a tiempo. A Ángel y Rebeca, por su amistad y palabras de aliento para concluir este trabajo.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	viii
Glosario.....	ix
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Nanomateriales de interés biomédico y nanotoxicidad.....	1
1.2 Antecedentes.....	5
1.3 Justificación.....	8
1.4 Hipótesis.....	8
1.5 Objetivos.....	9
<b>Capítulo 2. Materiales y Método</b>	<b>10</b>
2.1 Materiales.....	10
2.2 Caracterización óptica de los nanomateriales.....	11
2.3 Efecto en el crecimiento.....	11
2.4 Efecto en la fisiología.....	11
2.5 Efecto en la ultraestructura por microscopia electrónica de transmisión (TEM)...	12
2.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	13
<b>Capítulo 3. Resultados y Discusión</b>	<b>14</b>
3.1 Caracterización óptica de los nanomateriales.....	14
3.2 Efecto en el crecimiento.....	14
3.3 Efecto en la fisiología.....	16
3.4 Efecto en la estructura celular.....	22
<b>Capítulo 4. Conclusiones</b>	<b>27</b>
<b>Literatura citada.....</b>	<b>28</b>



## Lista de Figuras

Figura		Página
1	Productos disponibles en el mercado con nanomateriales.....	2
2	Rutas de exposición a nanomateriales.....	3
3	Efecto de los NIB dosis dependiente en el crecimiento.....	15
4	Efecto de los NIB en el material genético de <i>Dunaliella</i> sp.....	18
5	Efecto de los NIB en el material genético de <i>Isochrysis galbana</i> .....	19
6	Efecto de los NIB en el material genético de <i>Chaetoceros muelleri</i> .....	20
7	Efecto de los NIB en el estrés oxidante.....	21
8	Efecto de los NIB en la ultraestructura de <i>Dunaliella</i> sp.....	24
9	Efecto de los NIB en la ultraestructura de <i>Isochrysis galbana</i> .....	25
10	Efecto de los NIB en la ultraestructura de <i>Chaetoceros muelleri</i> .....	26

## Lista de Tablas

Tabla		Página
I	Secuencias de lavados para deshidratación de muestra.....	13
II	Análisis DLS de los NIB en medio de cultivo “f/2” .....	15
III	Efecto de los NIB en la producción de pigmentos fotosensibles.....	23

## Glosario

**Diámetro hidrodinámico:** Tamaño de una esfera sólida hipotética que difunde la luz de la misma manera que la partícula en medición, también se conoce como diámetro de Stokes (Instruments 2011).

**Nanomaterial:** Estructuras con al menos una dimensión menor a 100 nm.

**Nanotoxicología ambiental:** Estudio de las respuestas específicas de los organismos en sistemas acuáticos y terrestres por la interacción con nanomateriales, así como problemáticas relacionados con la liberación de nanomateriales en el ambiente.

**Nanopartículas (NP):** Material que tiene todas sus dimensiones inferiores a 100 nm.

**Nanomateriales de interés biomédico (NIB):** Nanomateriales diseñados para apoyar a la biomedicina y otros fines biotecnológicos

**Nanopartículas de tierras raras (NPs TR):** Nanopartículas que contienen o está dopadas con elementos pertenecientes al grupo de las tierras raras.

**Tierras raras:** Elementos químicos que incluyen al escandio (Sc), al itrio (Y) y al grupo de los lantánidos: lantano (La), cerio (Ce), praseodimio (Pr), neodimio (Nd), prometio (Pm), samario (Sm), europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb), disprosio (Dy), holmio (Ho), erbio (Er), tulio (Tm), iterbio (Yb) y lutecio (Lu).

**Potencial Z:** Cantidad de trabajo necesario para llevar una carga positiva del infinito a una superficie sin ninguna aceleración. Representa la diferencia de potencial entre una bicapa eléctrica de partículas electroforéticamente móviles y la capa de dispersante que las rodea (Bhattacharjee 2016). También se conoce como potencial electrocinético.

## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 Nanomateriales de interés biomédico y nanotoxicidad

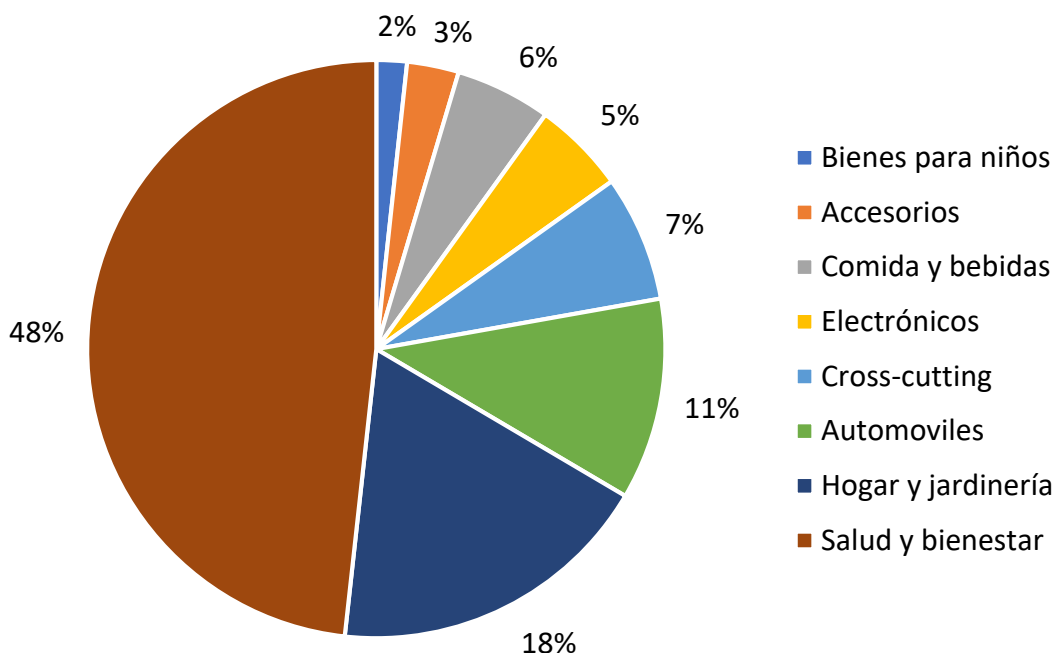
#### 1.1.1 Nanomateriales de interés biomédico

Los nanomateriales tienen propiedades, tanto físicas como químicas, que los vuelven distintos a los materiales en bulto. Esto les ha permitido ser utilizados en una amplia variedad de campos y aplicaciones. Los compuestos nanoestructurados existen de manera natural en bajas concentraciones. Ahora, con la masificación de los nanomateriales, cada vez es más fácil exponerse a ellos, lo que podría convertirse en un riesgo potencial para la salud y el medio ambiente.

La medicina es una de las áreas que se ha beneficiado de la nanotecnología. Los nanomateriales de interés biomédico (NIB), son aquellos diseñados para apoyar a la biomedicina y otros fines biotecnológicos. Pueden ser utilizados como tratamientos, métodos de detección y mecanismos de liberación de fármacos (McNamara y Tofail 2017). Los NIB tienen ventajas sobre los tratamientos tradicionales al ser más específicos, más biocompatibles y menos invasivos (Dowling et al., 2004). Por ejemplo, las nanopartículas de plata presentan propiedades antibacterianas por lo que podrían ser una alternativa contra la resistencia a antibióticos (Lara et al., 2010).

A pesar del incremento en la investigación de nanomateriales, no existen suficientes evaluaciones sobre su toxicidad (Marquis et al., 2009; Malik et al., 2011). Las pocas investigaciones existentes no siguen protocolos estandarizados y, en su mayoría, solo estudian los posibles riesgos para la salud humana (“Join the Dialogue” 2012; “The Dose Makes the Poison” 2011). Tampoco se ha dedicado suficiente atención a los desechos que se generan por el proceso de síntesis o al destino que tienen los nanomateriales después de utilizarlos. Aunque los beneficios del uso de NIB son muchos, existe la preocupación de que la explotación de las propiedades de estos nanomateriales pueda tener impactos negativos en la salud y el medio ambiente (Dowling et al., 2004).

La cantidad de productos que contienen nanomateriales cada vez es mayor. El 48% de éstos pertenecen a la categoría de cuidado de la salud (Vance et al., 2015), aunque están presentes en un amplia gama de artículos (Figura 1). Se estima que para 2020 se producirán alrededor de 58,000 toneladas métricas anuales de nanomateriales (Maynard 2006). Por lo tanto, resulta imperativo evaluar los efectos que estos materiales puedan generar en el medio ambiente.



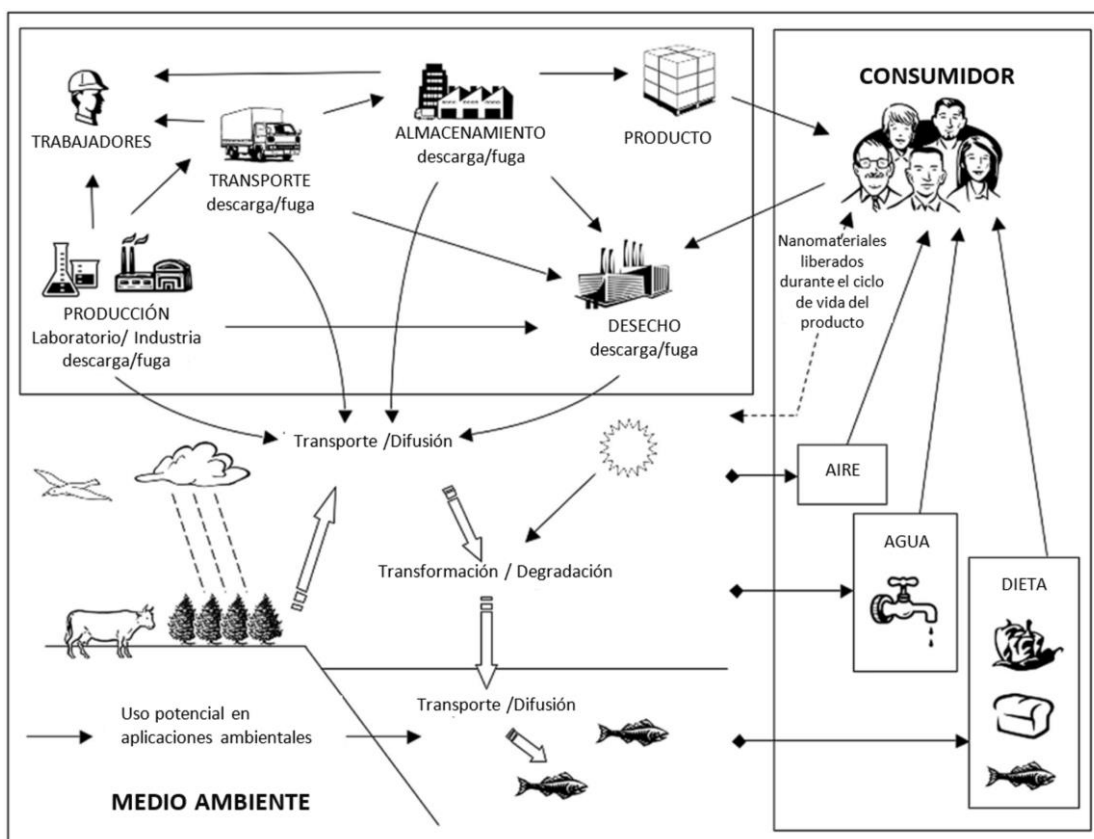
**Figura 1. Productos disponibles en el mercado con nanomateriales.** Productos disponibles para el consumidor, agrupados por categoría desde el 2007 al 2014. (Datos obtenidos de Vance et al., 2015).

### 1.1.2 Nanotoxicología

La nanotoxicología caracteriza y categoriza los efectos de salud causados por nanomateriales. Además, determina la relación entre la estructura y la función de las nanopartículas y su toxicidad (Marquis et al., 2009). Con el fin de emplear los NIB de manera segura y consciente, resulta indispensable que se evalúe el riesgo/beneficio de su uso. Cada nanomaterial debe ser sometido a estudios de citotoxicidad, ya que resulta imposible predecir las respuestas biológicas que pueden generar (Lewinski, Colvin, y Drezek 2008).

La toxicidad de una nanopartícula depende de sus características fisicoquímicas: tamaño, forma, carga superficial y cubierta. Debido a su reducido tamaño, la razón de área superficial-volumen se incrementa exponencialmente, favoreciendo a las reacciones que tienen lugar en la superficie (Oberdörster, Oberdörster, y Oberdörster 2005; Prasad 2012). Por otro lado, la exposición de las nanopartículas al ambiente puede resultar en la liberación de iones, aglomeración y degradación, derivando en cambios de su toxicidad.

No se puede evitar que los NIB terminen en la naturaleza. Existen muchas rutas por las cuales pueden ser liberados, ya sea de manera accidental o deliberada (Figura 2). Una vez en el ambiente, los NIB pueden alterarse por cambios de temperatura, pH, radiación, obteniéndose nuevos efectos tóxicos. La mayoría de las rutas de exposición convergen en medios acuáticos, por lo cual es necesario estudiar los efectos de los NIB en este tipo de ecosistemas.



**Figura 2. Rutas de exposición a nanomateriales.** Posibles rutas por las cuales los seres vivos podrían exponerse a NIB (Modificado de (Dowling et al., 2004)).

### 1.1.3 Microalgas

Las microalgas juegan un papel esencial en el equilibrio de los ecosistemas acuáticos, pues son la base de las redes tróficas. Asimismo, producen materia orgánica y oxígeno (Katiyar et al., 2017). Son microorganismos eucariotas fotosintéticos que pueden ser unicelulares o multicelulares. La mayoría se encuentra en agua dulce y marina. El resto de la biota acuática depende estrictamente de su actividad fotosintética, por lo que perturbaciones a las poblaciones de microalgas pueden dañar severamente a otras comunidades (Campanella et al., 2001). Además, por su rápido crecimiento y sensibilidad, son consideradas valiosos indicadores para la evaluación y monitoreo ambiental (Usher et al., 2014). Al conocer los efectos tóxicos que los NIB puedan tener en las microalgas se pueden prever otros efectos, como bioacumulación y bioaumentación.

En este estudio se analizó la toxicidad de  $Gd_2O_3: Er^{3+}/Yb^{3+}$  (3%, 2%) ( $Gd_2O_3: Er/Yb$ ),  $Y_3Al_5O: Pr$  (2%) (YAG: Pr), y Zeolita: Ag en tres concentraciones. Como modelo de estudio se utilizaron tres microalgas marinas: *Dunaliella* sp., *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*. Se evaluaron efectos fisiológicos como el crecimiento, el daño al material genético, la generación de especies reactivas de oxígeno y la producción de pigmentos fotosintéticos. Además, se analizaron daños a la ultraestructura y su bioacumulación.

Este trabajo es un primer paso para tener un panorama general del riesgo/beneficio del uso de estos nanomateriales. Los resultados de este trabajo pueden extenderse para evaluar los posibles efectos en bioacumulación y bioaumentación en los siguientes niveles de la cadena trófica.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Nanomateriales de interés biomédico

Existen diferentes tipos de nanomateriales de interés biomédico (NIB) como liposomas, virosomas, nanotubos de carbono, puntos cuánticos (QDs), dendrímeros, nanocristales y nanopartículas metálicas (Re, Moresco, y Masserini 2012; Weissig, Pettinger, y Murdock 2014). Algunos de estos NIB ya han sido aprobados en Estados Unidos, Europa, Corea del sur, China y Filipinas (Weissig, Pettinger, y Murdock 2014).

En el presente trabajo se utilizaron  $Gd_2O_3: Er/Yb$ , YAG: Pr y Zeolita: Ag por ser nanomateriales con uso potencial en el área biomédica. El  $Gd_2O_3: Er/Yb$  puede ser utilizado como biomarcador de células de cáncer (Chávez, Contreras, y Hirata 2016). Mientras que las nanopartículas YAG: Pr son nanocentelladores que al combinarse con ligandos podrían ser de gran utilidad en el campo médico.

### 1.2.2 Toxicidad de nanopartículas de tierras raras (NPs TR) en microorganismos

La presencia de distintos óxidos de tierras raras (23-590 nm), en concentraciones menores de  $500 \mu g mL^{-1}$ , no tiene efectos inhibitorios en *Vibrio fischeri*; por otro lado, las sales de Gd, Ce, Nd, Pr y La, la concentración media efectiva máxima ( $EC_{50}$ ) fue de 3.53, 6.70, 6.87, 12.17 y 20.93  $\mu g mL^{-1}$ , respectivamente (Kurve et al., 2017).

Las NPs de  $La_2O_3$  en concentraciones de  $50 \mu g mL^{-1}$  poseen actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus carnosus*, *Penicillium roqueforti* y *Chlorella vulgaris*, al competir por el fosfato libre en el medio, sin el cual los microorganismos no pueden sintetizar moléculas básicas (Gerber et al., 2012). Sin embargo, en concentraciones de  $10 mg mL^{-1}$  de  $La_2O_3$  NPs (100 nm), se observa inhibición de *Staphylococcus aureus*, pero no de *Escherichia coli* ni de *Pseudomonas aeruginosa* (Balusamy et al., 2012). En hongos como *Pythium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Scelerotinia sclerotiorum*, la  $EC_{50}$  de las  $La_2O_3$  NPs se encuentra entre 130 y  $320 \mu g mL^{-1}$ .



### 1.2.3 Toxicidad de las AgNPs en microorganismos

En bacterias, se ha encontrado que las AgNPs en concentraciones de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , inhiben el crecimiento de *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa* (Raman et al., 2017), y son 100% efectivas en *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* (Shrivastava et al., 2007). En AgNPs de 1-10 nm, el efecto tóxico se debe a que éstas se unen a la superficie celular evitando la permeabilidad, se internalizan e interactúan con el ADN y liberan iones de plata (Morones et al., 2005). Por otro lado, algunos hongos como *Candida albicans*, *Malassezia furfur* y *Trichophyton erinacei* tienen una concentración mínima inhibitoria de 64, 16 y  $192 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, de AgNPs de 12.7 nm (Wypij et al. 2017), mientras que distintas especies de *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilhermondii*, y *C. albicans*) son inhibidas en su totalidad con concentraciones de 0.5 a  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AgNPs de 3 nm (Gutiérrez et al., 2018). Bajo condiciones estandarizadas, se ha observado que las AgNPs inhiben a microorganismos de distinto grado de complejidad, en el mismo intervalo de concentraciones (Vazquez-muñoz et al., 2017).

### 1.2.4 Toxicidad de nanomateriales en microalgas

La información sobre la toxicidad de nanomateriales en microalgas es limitada, debido a que antes de 2006 los artículos publicados al respecto eran muy escasos. Los nanomateriales más frecuentemente empleados para evaluar la toxicidad en estos organismos son la plata y los óxidos de metales (Tang et al., 2018). Aunque son más populares las evaluaciones utilizando microalgas de agua dulce, se ha resaltado la importancia de también estudiar a las de agua marina también, debido a que el ambiente marino es, generalmente, más alcalino, tiene mayor fuerza iónica y es más rico en variedad de coloides y materia orgánica, lo que puede alterar a los nanomateriales (Klaine et al., 2008).

### 1.2.5 Toxicidad de tierras raras en microalgas

Las tierras raras son elementos químicos que incluyen al escandio (Sc), al itrio (Y) y al grupo de los lantánidos: lantano (La), cerio (Ce), praseodimio (Pr), neodimio (Nd), prometio (Pm), samario

(Sm), europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb), disprosio (Dy), holmio (Ho), erbio (Er), tulio (Tm), iterbio (Yb) y lutecio (Lu).

Distintos trabajos indican que las microalgas pueden presentar efectos estimulatorios al exponerse a tierras raras (Miazek et al., 2015). *Skeletonema costatum* (microalga marina) no distingue entre los diferentes lantánidos, ya que presenta efectos similares con todos (producción de biomasa y capacidad fotosintética), ya sea de manera individual o en mezclas, en concentraciones de 5-60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Tai et al., 2010). En *Desmodesmus quadricauda* (microalga de agua dulce), la presencia de Ce (3-12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) estimuló hasta 16% la tasa de crecimiento específica (Goecke et al., 2015); el uso de La y Gd (10  $\mu\text{M}$ ) indujo un incremento del peso seco, comparado con el control, de 20-36% y 8-14%, respectivamente (Rezanka et al., 2016). Además, en medios deficientes de calcio y manganeso, la presencia de tierras raras (Ce, Eu, Gd, La y Nd) estimuló el crecimiento de *D. quadricauda* (Goecke et al., 2015). En la misma microalga se observó un aumento de pigmentos fotosintéticos tras la exposición a lantánidos (La, Ce, Nd y Gd, 10  $\mu\text{M}$ ) y un aumento de tres veces en la tasa fotosintética a intensidades bajas de luz (Rezanka et al., 2016).

Las tierras raras se pueden bioacumular: en *D. quadricauda* se observó acumulación en distintas partes de la célula; La y Gd se concentraron en el citoplasma, mientras que Nd y Ce se observaron en los cloroplastos (Rezanka et al., 2016). *Parachlorella kessleri* (microalga de agua dulce y terrestre) no mostró diferencias significativas de crecimiento, entre el control y la presencia de lantánidos (Sc, La, Ce, Pr, Gd, Lu), pero presenta un aumento de pigmentos fotosintéticos con La, Ce, Pr, Gd y Lu (Goecke et al., 2017). Por otro lado, el crecimiento de *Trachydiscus minutus* (microalga de agua dulce) se estimula en condiciones óptimas de cultivo con la exposición de Sc, La y Ce, pero no hay modificaciones en cuanto a producción de pigmentos (Goecke et al., 2017). La literatura evidencia que la presencia de tierras raras, en bajas concentraciones, no presenta efectos tóxicos en microalgas.

### 1.2.6 Toxicidad de nanomateriales de plata en microalgas

La toxicidad de las nanopartículas de plata (AgNPs) varía de acuerdo con su tamaño y su concentración. Distintos artículos reportan discrepancias en *Pseudokirchneriella subcapita* en cuanto al efecto de AgNPs 10-80 nm (Ivask et al., 2014), y  $32.40 \mu\text{g L}^{-1}$  sobre el  $\text{EC}_{50}$ :  $0.36 \text{ mg L}^{-1}$  (Bondarenko et al., 2013),  $0.007\text{-}1.14 \text{ mg L}^{-1}$  (promedio  $0.72 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Ribeiro et al., 2014). Por otro lado, cuando las AgNPs se colocan en agua Mili-Q mantienen un tamaño de  $56 \pm 5 \text{ nm}$  por varias semanas, pero al exponerse a medios de cultivo, se agregan y crecen hasta alcanzar  $300 \text{ nm}$  ( $5\text{-}10 \mu\text{M}$ ) y  $500 \text{ nm}$  ( $20 \mu\text{M}$ ) en una hora (He, Dorantes-Aranda, y Waite 2012). *Chatonella marina* (microalga marina) acumula el 25% de AgNPs [ $2.0 \mu\text{M}$ ] tras exponerse durante una hora, además, su viabilidad se reduce del 18-96% con respecto al control al incubarse con AgNPs [ $0.02\text{-}50.0 \mu\text{M}$ ] (He, Dorantes-Aranda, y Waite 2012).

Cuando *C. marina* se expone a las AgNPs, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se incrementa hasta en un 41% (He, Dorantes-Aranda, y Waite 2012), mientras que después de 8 días en incubación, *Chlorella vulgaris* (microalga de agua dulce) y *Dunaliella tertiolecta* (microalga marina), presentan un incremento en la formación de ROS de 68% y 73%, respectivamente, en comparación con el control (Hazani et al., 2013). La actividad fotosintética de *Chlamydomonas reinhardtii* (microalga de agua dulce y terrestre) disminuye al incubarse con AgNPs en concentraciones de 5 y  $10 \mu\text{M}$  (Navarro et al., 2008). De acuerdo con esto, las nanopartículas de plata tienen efectos negativos en los cultivos de microalgas.

### 1.3 Justificación

Cada vez es más común la presencia de nanomateriales en la vida cotidiana. Gran parte de esta exposición se debe a nanomateriales de interés biomédico (NIB), los cuales pueden ser utilizados por la medicina como tratamientos, métodos de detección y mecanismos de liberación de fármacos. A pesar de la creciente investigación y producción de NIB, la información relacionada a su toxicidad es limitada, y no hay suficiente interés sobre el riesgo que pueden generar al medio ambiente.

Se propone la evaluación de NIB en microalgas debido a su importancia ambiental como base de las redes tróficas acuáticas, así como productores de oxígeno y de materia orgánica. Además de que son considerados indicadores ambientales debido a su rápido crecimiento y sensibilidad. El uso de microalgas marinas se debe a que, a diferencia del agua dulce, el agua marina tiene mayor pH y fuerza iónica. Esto puede resultar en la alteración de las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales (Klaine et al., 2008), generando cambios en su toxicidad.

## 1.4 Hipótesis

Los nanomateriales de interés biomédico  $Gd_2O_3: Er^{3+}/Yb^{3+}$  (3%, 2%) ( $Gd_2O_3: Er/Yb$ ),  $Y_3Al_5O: Pr$  (2%) (YAG: Pr), y Zeolita: Ag afectarán la estructura y la fisiología de las microalgas.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los nanomateriales de interés biomédico ( $Gd_2O_3: Er^{3+}/Yb^{3+}$ ,  $Y_3Al_5O: Pr$  y Zeolitas: AgNPs) en el crecimiento, fisiología y estructura de las microalgas modelo *Dunaliella sp.*, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri*.

### 1.5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar los nanomateriales pre- y post-tratamiento.
- Determinar el efecto de los nanomateriales de interés biomédico en el crecimiento de las microalgas.
- Evaluar si los nanomateriales de interés biomédico afectan la capacidad fotosintética.
- Evaluar si los nanomateriales de interés biomédico provocan estrés oxidante en las algas.
- Observar si los nanomateriales de interés biomédico generan un daño en la ultraestructura celular.

## Capítulo 2. Materiales y Método

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Nanomateriales

Se evaluó el efecto de nanomateriales de interés biomédico (NIB). Dos nanopartículas (NPs) dopadas con tierras raras y una con plata. Todos los NIB se obtuvieron del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- $Gd_2O_3: Er^{3+}/Yb^{3+}$  (3%, 2%)  
Esferas de 50 nm  $\pm$  10 nm con absorción de luz en infrarrojo cercano ( $\lambda=980$  nm) con picos de emisión en 561-563 nm (verde) y 661-663 nm (rojo), siendo el rojo más intenso que el verde. Se sintetizaron por método de sol-gel (Chávez, Contreras, y Hirata 2016).
- $Y_3Al_5O: Pr$  (2%)  
Esferoides de 75 nm  $\pm$  3.2 nm con superficie lisa, longitud de onda de excitación de 290 nm y emisión en el espectro visible. Se sintetizaron por método de sol-gel (Sengar et al., 2016).
- Zeolita: Ag  
Zeolita tipo modernita de 60  $\mu$ m dopada con AgNPs de 3-10 nm, sintetizadas con el método descrito en la solicitud de patente MX/a/2012/013218 (Jaime-Acuña et al., 2016).

Los tratamientos se prepararon diluyendo los nanomateriales en agua destilada, homogenizando por sonicación por 20 min y esterilizando en luz UV por 15 min.

#### 2.1.2 Microalgas y condiciones de cultivo

Para evaluar la toxicidad de los NIB se utilizó *Dunaliella* sp. (clorofita sin pared celular), *Isochrysis galbana* (haptofita con pared celular) y *Chaetoceros muelleri* (diatomea con pared celular). Todas las cepas se obtuvieron del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Las microalgas se cultivaron en medio "f/2" en agua

de mar. El medio de *Chaetoceros muelleri* fue adicionado con silicatos. Los experimentos se realizaron con los cultivos en el primer día de la fase exponencial de crecimiento.

## 2.2 Caracterización óptica de los nanomateriales

Mediante la técnica de dispersión de la luz dinámica (DLS) se determinó el diámetro hidrodinámico y el potencial Z de los NIB en medio “f/2” en el tiempo inicial y después de 24 horas de exposición. En una celda (Malvern) se colocaron 1.2 mL de cada muestra a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  y se midieron en un Zetasizer Nano-Zs (Malvern, EUA), a 25 °C. La celda se enjuagó con agua desionizada después de cada medición.

## 2.3 Efecto en el crecimiento

Cada una de las cepas de microalgas (MA) se expuso a los distintos tratamientos de manera independiente. Las concentraciones finales de los tratamientos –en los cultivos de microalgas- fueron: 1, 10 y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se incluyó un cultivo control (sin tratamiento). Todas las pruebas se hicieron por triplicado, a 180 rpm, 20°C y con luz continua, por 24 h. Posteriormente, cada cultivo se diluyó 1:5 con el medio correspondiente (según la cepa de microalga) y se fijó con Lugol. Se determinó la concentración de células mediante el conteo de células en una cámara de Neubauer, por triplicado.

## 2.4 Efecto en la fisiología

Para las pruebas de fisiología, se evaluó el efecto de los NIB sobre las MA, las cepas se expusieron a los distintos tratamientos, de manera independiente bajo las siguientes condiciones. La concentración final de los tratamientos –en los cultivos de microalgas- fue de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas las pruebas se hicieron por triplicado, con luz continua. Los tiempos de exposición, la agitación y la temperatura variaron según el ensayo.

### 2.4.1 Efecto en material genético

Las microalgas se cultivaron bajo las condiciones descritas, a 180 rpm, 20°C y con un tiempo de exposición –a los tratamientos- de 24 h. Posteriormente se centrifugaron a 1,500 rpm por 4 min, se retiró el sobrenadante y se almacenaron en glutaraldehído al 2%, a 4°C.

Para analizar las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se incubaron con DAPI (300 µM, diluido en PBS) por 5 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se observaron en un microscopio invertido Zeiss a 40x con AxioCam IC. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando Zen 2.3 (blue edition) de Zeiss.

### 2.4.2 Determinación de estrés oxidativo

Las microalgas se cultivaron bajo las condiciones descritas, con un tiempo de exposición a los tratamientos de 1 h, con agitación constante, y con luz y temperatura ambiente. Se incluyó un cultivo control con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM.

Las cepas con los tratamientos se agregaron, por triplicado, en una microplaca de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 100 µL de los tratamientos, se agregaron 2 µL de H<sub>2</sub>DCFDA (5 mM) y se incubó 5 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Se midió la longitud de onda de emisión a 522 nm tras excitar a 493 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Agilent.

### 2.4.3 Producción de pigmentos fotosintéticos

Las microalgas se cultivaron bajo las condiciones descritas, a 180 rpm, 20°C y con un tiempo de exposición a los tratamientos de 24 h. Transcurrido el tiempo de exposición se centrifugaron a 4,000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se almacenaron a -20°C.

Para la obtención de los pigmentos fotosintéticos, se realizaron tres extracciones. Los cultivos se centrifugaron a 2,000 xg en tubos cónicos por 15 min a 4°C en un centrifuga Thermo Scientific Heraeus, Megafuge 16R, y se retiró el sobrenadante. El precipitado se traspasó a un vial de plástico; a *I. galbana* y a *C. muelleri* se le agregaron 0.2 g de esferas de circonio/sílice de 0.5 mm Biospec products, Inc. Posteriormente, se les agregó 1 mL de metanol 100% grado HPLC y 5 µL

del antioxidante BHT. Se homogenizó en vórtex por 60 s, y se incubó a 4°C por 1.5 h. Transcurrido este tiempo, se sonicó en baño de hielo por 5 min y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a 4°C en tubos de vidrios con una capa de N<sub>2</sub>.

Se agregó 1 mL de cloroformo 100% grado HPLC y 2 mL de agua destilada, se dejó reposar a temperatura ambiente hasta observar dos fases. La capa superior se retiró utilizando una pipeta Pasteur, y el resto se evaporó utilizando N<sub>2</sub>. Se agregaron 100 µL de metanol y se filtró con membrana PTFE de 0.2 µm. Finalmente se agregó acetato de amonio 1M a una proporción final de 2:1 (Vidussi et al. 1996) (muestra en metanol: acetato de amonio). El análisis se realizó en un espectrofotómetro HACH DR 6000. Para la cuantificación de los pigmentos se utilizaron las ecuaciones indicadas en Arredondo y Voltolina (2017):

*Dunaliella*: Clorofila a = 11.93 A664 - 1.93 A647 y Clorofila b = 20.36 A647 - 5.50 A664

*I. galbana* y *C. muelleri*: Clorofila a = 11.47 A664 - 0.4 A630 y Clorofila c1+c2 = 24.36 A630 - 3.73 A664.

## **2.5 Efecto en la ultraestructura por microscopia electrónica de transmisión (TEM)**

Las microalgas se cultivaron bajo las condiciones descritas, a 180 rpm, 20°C y con un tiempo de exposición a los tratamientos de 24 h. Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos (pH 7.2) 0.16 M por 2 horas, al finalizar, se realizaron tres lavados de 10 minutos con amortiguador de cacodilatos. Las muestras se posfijaron con tetraóxido de osmio al 1 % en amortiguador de cacodilatos por 2 horas, posteriormente, se enjuagaron tres veces en amortiguador de cacodilatos por 10 minutos. La deshidratación se realizó siguiendo las especificaciones en la Tabla I

Se preparó una mezcla 1:1 de óxido de propileno con resina epón (Epon 812, EMS) y se dejó toda la noche (17h), luego, se evaporó el óxido de propileno hasta obtener volumen inicial de resina. Con la resina se prellenaron las muestras, se orientaron y se prosiguió a completar el llenado de los moldes. Se dejó polimerizar en estufa a 60°C toda la noche.



**Tabla I.** Secuencia de lavados para deshidratación de muestra.

	Número de lavados	Tiempo (min)
Etanol 50%	1	10
Etanol 70%	1	10
Etanol 90%	1	10
Etanol 96%	2	15
Etanol 100%	3	15
Óxido de propileno	2	10

Todos los reactivos utilizados son de Electron Microscopy Sciences (EMS, Pa, USA). Las muestras se cortaron en un ultramicrotomo (RMC/PT XL, Boeckeler Instruments, Inc. Tucson, AZ USA), se obtuvieron ultrafinos de 60 nm y se recogieron o montaron en rejillas de cobre de 200 mesh. (No tenían formvar ni carbón). las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo por 5 minutos y citrato de plomo por 3 minutos. Se evaluaron en un microscopio de transmisión Jeol JEM-1011 (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) a 80 Kv.

## 2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

En general, todos los experimentos fueron diseñados para tener al menos tres replicados de cada cultivo. Todos los análisis estadísticos de  $p$  fueron realizados usando GraphPad Prism, versión 7.05, con una ANOVA de una vía, con la prueba descrita en los pies de figura. Los diagramas de barra están representados como promedio  $\pm$  desviación estándar.

## Capítulo 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Caracterización óptica de los NIB

Se midió el diámetro hidrodinámico y potencial Z de YAG: Pr y Zeolita: Ag en medio “f/2” (Tabla I). El tamaño y la estabilidad de los NIB evaluados variaron del tiempo inicial ( $t_0$ ) al tiempo final ( $t_{24}$ ). Los diámetros hidrodinámicos de YAG: Pr y Zeolita: Ag aumentaron 535 nm y 322 nm, respectivamente.

**Tabla II.** Análisis DLS de los NIB en medio de cultivo “F/2”.

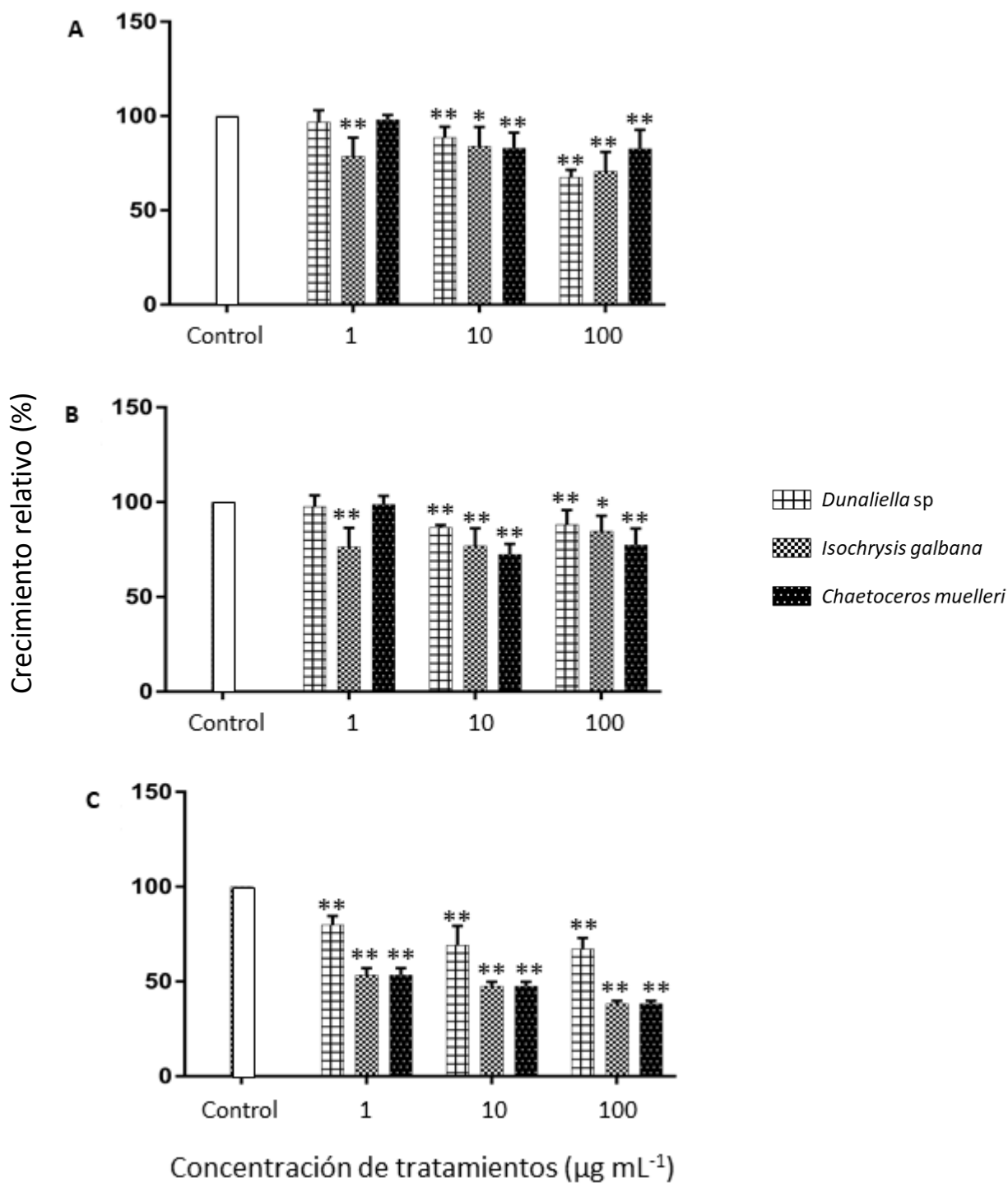
	Diámetro Hidrodinámicos (nm)			Potencial Z (mV)		
	$t_0$ *	$t_{24}$ **	$\Delta t$ ***	$t_0$ *	$t_{24}$ **	$\Delta t$ ***
<b>YAG: Pr “f/2”</b>	1329	1864	535	-1.92	-7.12	-5.20
<b>Zeolita: Ag “f/2”</b>	1089	1411	322	-6.93	-11.1	-4.17

\*  $t_0$  = tiempo inicial; \*\*  $t_{24}$  = tiempo final (24 h); \*\*\*  $\Delta t$  = diferencia entre los valores  $t_0$  y  $t_{24}$ .

Al medir el potencial Z, los valores absolutos mayores a 15 indican estabilidad de los nanomateriales, mientras que en valores inferiores tienden a agregarse y precipitarse. El signo del valor se relaciona con la carga del nanomaterial. El potencial Z de ambos NIB es mayor en  $t_{24}$  que en  $t_0$ , sin embargo, este incremento no es suficiente para que sean considerados estables. La desestabilidad de los NIB puede deberse a la fuerza iónica que el medio “f/2” puede tener. Esta influencia puede observarse desde  $t_0$ , ya que cuando YAG: Pr y Zeolita: Ag están en agua destilada tiene un potencial Z de -53.43 y -63.70 mV (Guiochin-Marín 2016), respectivamente.

### 3.2 Efecto en el crecimiento

Para examinar los efectos de los nanomateriales en el crecimiento de las microalgas, los cultivos fueron expuestos a distintas concentraciones de los tratamientos. Después de 24 horas de exposición se detectó un decremento del crecimiento, tratamiento dosis dependiente (Fig. 3).



**Figura 3. Efecto de los NIB dosis dependiente en el crecimiento.** **A** Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Yb/Er, **B** YAG: Pr y **C** Zeolita: Ag, a 1, 10 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en *Dunaliella sp.*, *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros muelleri* por 24 h. Para determinar la significancia se utilizó una ANOVA de una vía con la prueba Holm-Sidak, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$  comparado con su respectivo control, ajustado al 100% para cada microalga.

Todos los tratamientos disminuyeron el crecimiento de los cultivos. El nanomaterial más agresivo resultó ser Zeolitas: Ag, ya que incluso en la concentración más baja, en *I. galbana* y *C. muelleri*, provocó un decremento del crecimiento de casi el 50%. En las otras microalgas, desde la concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ya se observan efectos severos por acción de este tratamiento. Las nanopartículas de  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ : Yb/Er inducen efectos severos, principalmente en el crecimiento de *Dunaliella sp.* e *I. galbana* en la concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que, en las dosis más bajas, el impacto es moderado. Por otro lado, la exposición a YAG: Pr parece ser la menos agresivas, puesto que solo se observan efectos severos a  $10$  y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  en *C. muelleri*, mientras que en el resto de las especies los efectos son moderados en las mismas concentraciones. En general, las nanopartículas con tierras raras (NPs TR) muestran efectos menos severos en comparación con las Zeolitas: Ag. Esto era previsto por la conocida capacidad de las nanopartículas de plata, las cuales liberan iones que pueden tener actividad microbicida.

La sensibilidad de las microalgas a los tratamientos depende de la especie. Tanto *Dunaliella sp.* como *I. galbana*, presentan respuestas similares a los nanomateriales, siendo *C. muelleri* la especie más sensible. Este resultado es sorprendente debido a que, al ser *C. muelleri* una diatomea, se espera que sea menos sensible que las algas verdes.

A partir de estos resultados, se determinó utilizar la concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  para los experimentos siguientes.

### **3.3 Efecto en la fisiología**

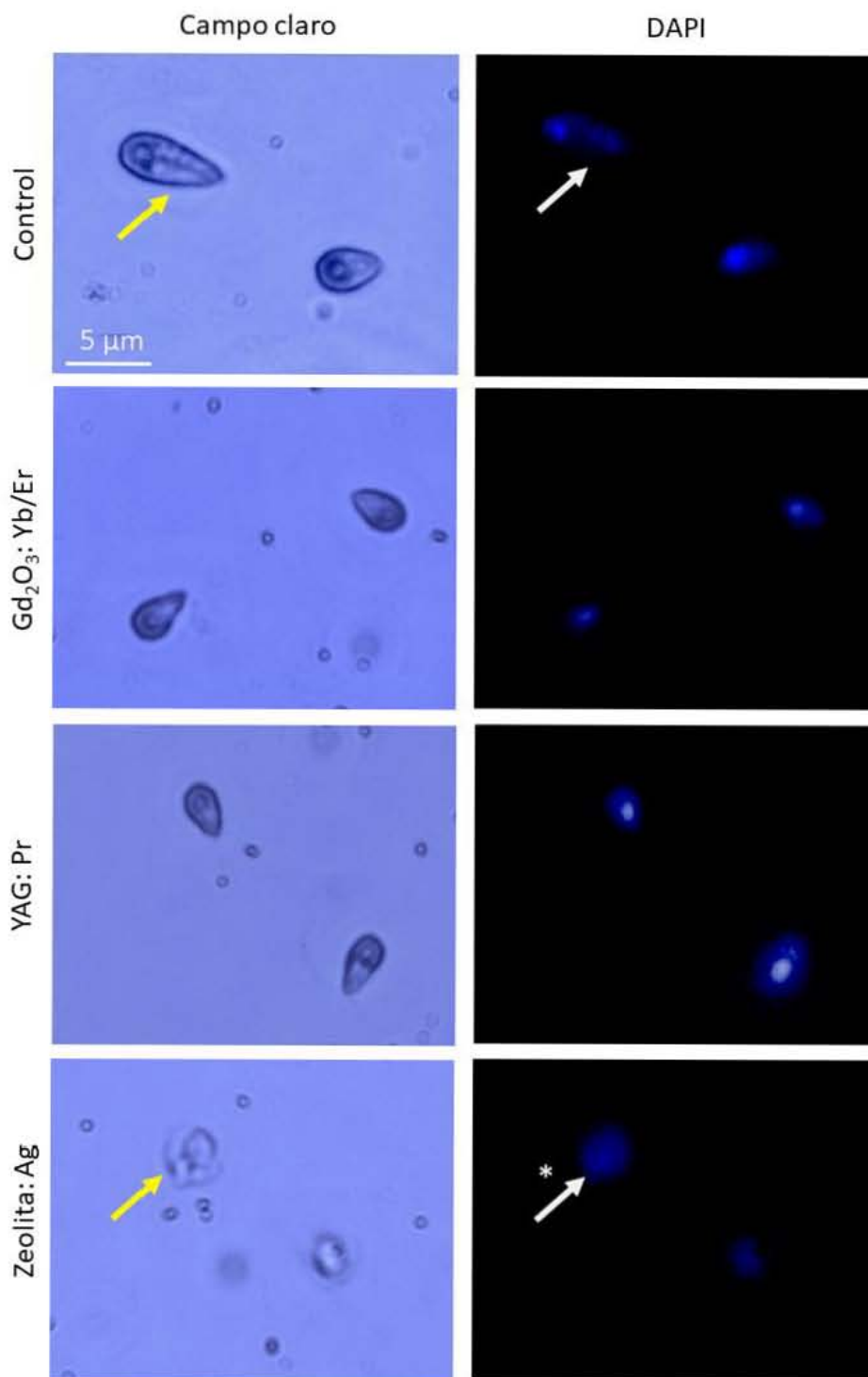
#### **3.3.1 Efecto en material genético**

Con el objetivo de determinar la presencia de daño al material genético, las microalgas fueron expuestas a los NIB ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24 horas. Posteriormente, se incubó con DAPI por 5 minutos. El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un fluoróforo que emite en color azul al enlazarse a regiones AT (adenina y timina) del ADN. Un punto azul intenso concentrado es señal de que el núcleo está definido; sin embargo, la difusión de la coloración es indicativo de fragmentación nuclear.

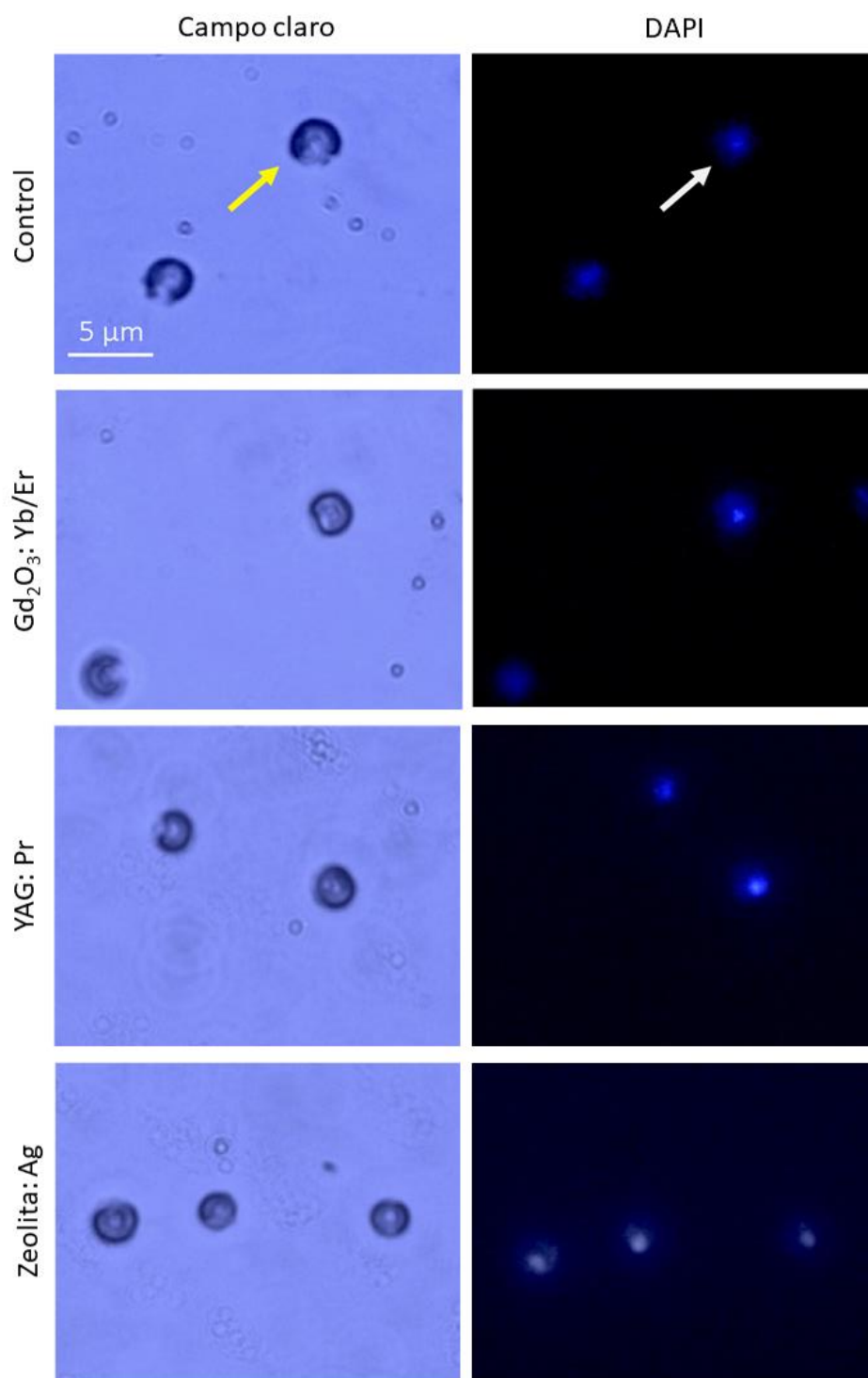
En la mayoría de los casos, la exposición a los NIB no resultó en cambios aparentes (Fig. 4, 5 y 6). La exposición a YAG: Pr no provocó ningún cambio morfológico ni alteraciones en el núcleo de ninguna de las especies analizadas. Lo mismo se observó para *Dunaliella* sp. y *I. galbana* con los tratamientos de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Yb/Er y Zeolitas: Ag, donde tampoco se aprecian modificaciones evidentes (Fig. 4 y 5).

Por otro lado, *C. muelleri*, parece sensible a estos dos últimos tratamientos. Con Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Yb/Er, la célula es amorfa y carece de las estructuras celulares presentes en el control, además de que la coloración correspondiente al núcleo es difusa y poco intensa (Fig. 6, panel superior). La exposición a Zeolita: Ag, resulta en células amorfas, con aumento de tamaño evidente y presencia de núcleos definidos (Fig. 6, panel inferior). Se puede apreciar, que existen dos núcleos para lo que corresponde a la estructura celular, por lo que también se puede sospechar de aglomeración de las células.

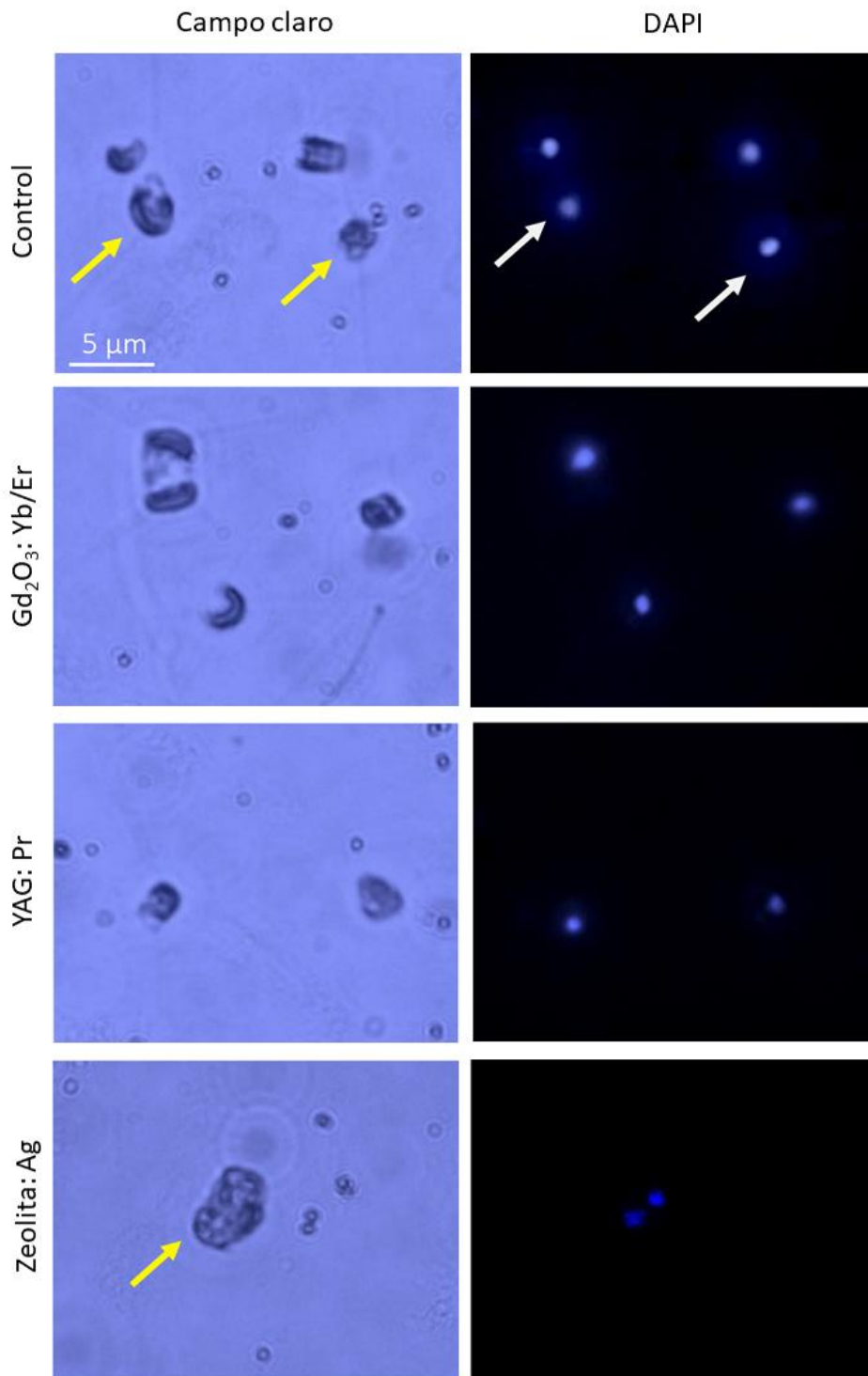
Congruente con los resultados obtenidos en la sección anterior, los NIB que tienen los efectos menos perjudiciales es YAG: Pr, siendo *C. muelleri*, la microalga más sensible.



**Figura 4. Efecto de los NIB en el material genético en *Dunaliella* sp.** El cultivo se expuso a 100 µg mL<sup>-1</sup> de NIB por 24 horas e incubado con DAPI. La flecha amarilla señala a las células, mientras que la flecha blanca indica la presencia del núcleo, y el [\*] la presencia de células sin núcleo.



**Figura 5. Efecto de los NIB en el material genético en *Isochrysis galbana*.** El cultivo fue expuesto a 100 µg mL<sup>-1</sup> de NIB por 24 horas e incubado con DAPI. La flecha amarilla señala a las células y la blanca al núcleo.



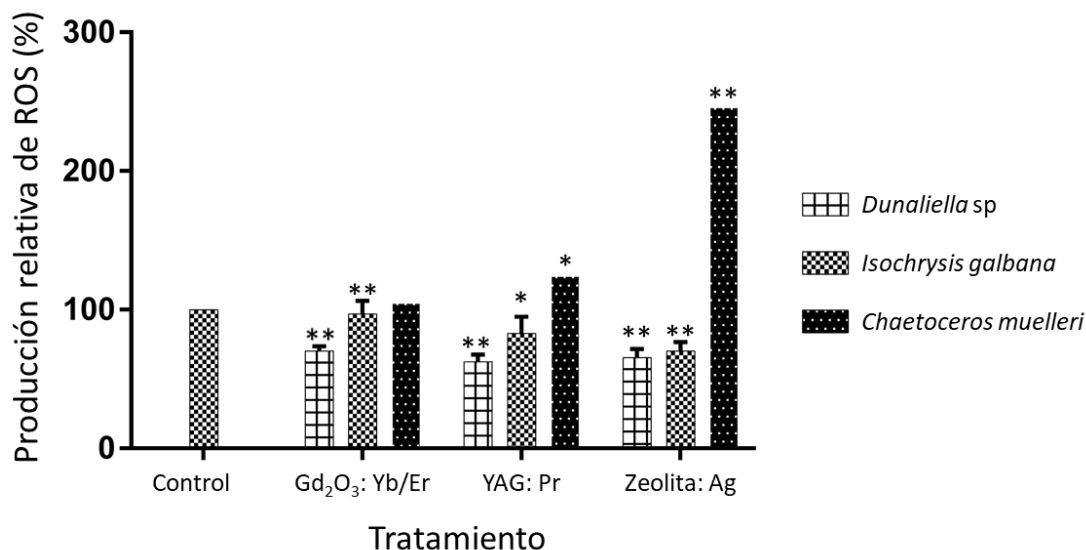
**Figura 6. Efecto de los NIB en el material genético en *Chaetoceros muelleri*.** El cultivo fue expuesto a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NIB por 24 horas e incubado con DAPI. La flecha amarilla señala a las células y la blanca al núcleo.



### 3.3.2 Efecto por estrés oxidante

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las microalgas expuestas a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NIB, se midió por la fluorescencia de 2'-7' diclorodihidrofluoresceindiacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). La H<sub>2</sub>DCFDA es una molécula que en presencia de ROS es oxidada, degradándose en el producto fluorescente diclorofluoresceína (DCF). El incremento en fluorescencia es proporcional al incremento de ROS intracelular.

La cantidad de ROS generadas por acción de los NIB, parece ser dependiente del tipo de nanomaterial y de la especie. Se observa un ligero decremento en las algas verdes tras la exposición con NIB, pero esta disminución se vuelve significativo para *Dunaliella* sp. e *I. galbana* con YAG: Pr y Zeolita: Ag, respectivamente (Fig. 7). El único incremento severo de ROS fue con Zeolita: Ag en *C. muelleri*, llegando a ser casi 2.5 veces mayor que el control.



**Figura 7. Efecto de los NIB en el estrés oxidante.** Los cultivos fueron expuestos a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NIB por una hora. Para determinar la significancia se utilizó una ANOVA de una vía con la prueba del método de Dunnett, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$  comparado con su respectivo control ajustado al 100%.

Los niveles elevados de ROS intracelular son una característica de estrés oxidante, lo cual a su vez es indicativo de la alteración de la salud de la célula (Li et al., 2012). El incremento de ROS en

*C. muelleri* con el tratamiento de Zeolita: Ag, refleja daño celular severo. Esto le proporciona coherencia a los resultados anteriores, donde se ha determinado que la Zeolita: Ag genera los efectos más severos y que la diatomea ha resultado un tipo de microalgas más sensible. Por otro lado, la excesiva generación de ROS en esta especie, puede ser la causa de los efectos vistos anteriormente.

### 3.2.3 Producción de pigmentos fotosintéticos

El contenido de pigmentos fotosensibles fue calculado para cada especie, clorofila a y b para *Dunaliella* sp., y clorofila a, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub> para *I. galbana* y *C. muelleri* (Tabla III).

**Tabla III.** Efecto de los NIB en la producción de pigmentos fotosensibles.

Microalga	Tratamiento	Contenido de pigmentos fotosensibles ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
		Clorofila a	Clorofila b	Clorofila c <sub>1</sub> + c <sub>2</sub>
<i>Dunaliella</i> sp.	Control	0.04	0.04	N/A
	Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Yb/Er	0.07	0.09	N/A
	YAG: Pr	0.10	0.11	N/A
	Zeolita: Ag	0.09	0.11	N/A
<i>Isochrysis galbana</i>	Control	0.13	N/A	0.05
	Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Yb/Er	0.13	N/A	0.05
	YAG: Pr	0.11	N/A	0.04
	Zeolita: Ag	0.20	N/A	0.06
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Control	0.82	N/A	0.65
	Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : Yb/Er	0.26	N/A	0.08
	YAG: Pr	0.16	N/A	0.04

N/A: No aplica.

Para el caso de *Dunaliella* sp. se encontró que en presencia de los NIB hubo un incremento de la cantidad de pigmentos de casi dos o tres veces, en comparación con el control. En *I. galbana*, el tratamiento con Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Yb/Er no altera la producción de pigmentos. Con YAG: Pr hubo una ligera disminución, mientras que con Zeolita: Ag la cantidad de clorofila a aumentó en gran medida, pero no tanto en la clorofila c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub>. Por otro lado, los pigmentos en *C. muelleri*, disminuyeron con los tratamientos con NP TR, no fue posible medir los pigmentos con Zeolita: Ag.

De acuerdo con esta prueba, la exposición a los tratamientos para el caso de las algas verdes no disminuye la producción de pigmentos fotosensibles, si no que se obtienen valores similares e incluso mayores. Sin embargo, para el caso de *C. muelleri*, los tratamientos disminuyen en gran medida la cantidad de pigmentos.

### 3.4 Efecto en la estructura celular

#### 3.4.1 Observación de la morfología mediante microscopía óptica

La microscopia óptica permitió observar los efectos de las NPs en la morfología de las microalgas (Fig. 5, 6 y 7). En *Dunaliella* sp., se puede observar un decremento del tamaño de las células que fueron expuestas a las NPs TR; sin embargo, la forma se mantiene. Pero al estar expuestas a Zeolita: Ag, las células se ven dañadas estructuralmente. De igual manera, *C. muelleri* no sufrió ninguna alteración en presencia de NPs TR, pero con Zeolita: Ag, las células se ven aglomeradas. Ninguno de los tratamientos tuvo efecto morfológico en *I. galbana*.

#### 3.4.2 Análisis de la ultraestructura mediante TEM

Los efectos a la ultraestructura celular de las microalgas fueron observados mediante TEM, después de haber sido expuestas a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de los tres NIB por 24 horas.

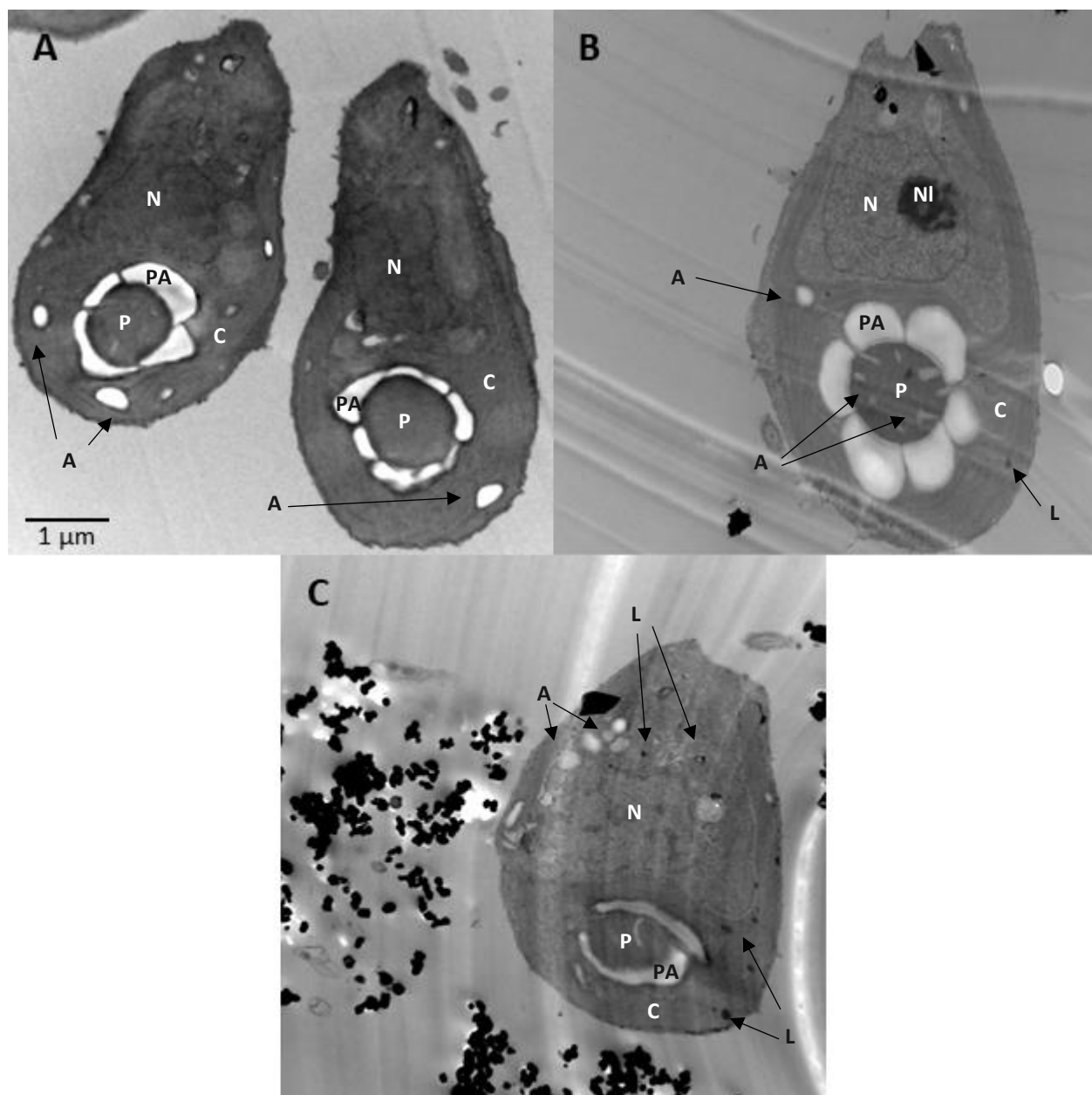
En general, *Dunaliella* sp. mantuvo su forma elipsoide característica tanto en el control como en los tratamientos, así como su organización celular (Fig. 8) (Bérubé, Dodge, and Ford 1999). En las células tratadas con  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ : Yb/Er se observa un incremento del tamaño de la placa de almidón del pirenoide, así como la formación de gotas de almidón en el pirenoide (Fig. 8B). Por otro lado, aquellas que estuvieron expuestas a YAG: Pr, presentan una forma celular menos elíptica, así como la reducción del tamaño del pirenoide y la aparición de gotas de almidón (Fig. 8C). El aumento de almidón en lugar de su degradación está asociada a la acumulación y síntesis de glicerol, el cual es necesario para cubrir necesidades de osmorregulación (Lilley et al. 1987). Sin embargo, una disminución del pirenoide puede ser causada por la pérdida de RuBisCO hacia el

estroma del cloroplasto (Bérubé, Dodge, y Ford 1999). Además, se ha reportado que las microalgas utilizan la acumulación de lípidos para absorber xenobióticos lipofílicos y disminuir su biodisponibilidad en la célula (Yang, Wu, y Kong 2002).

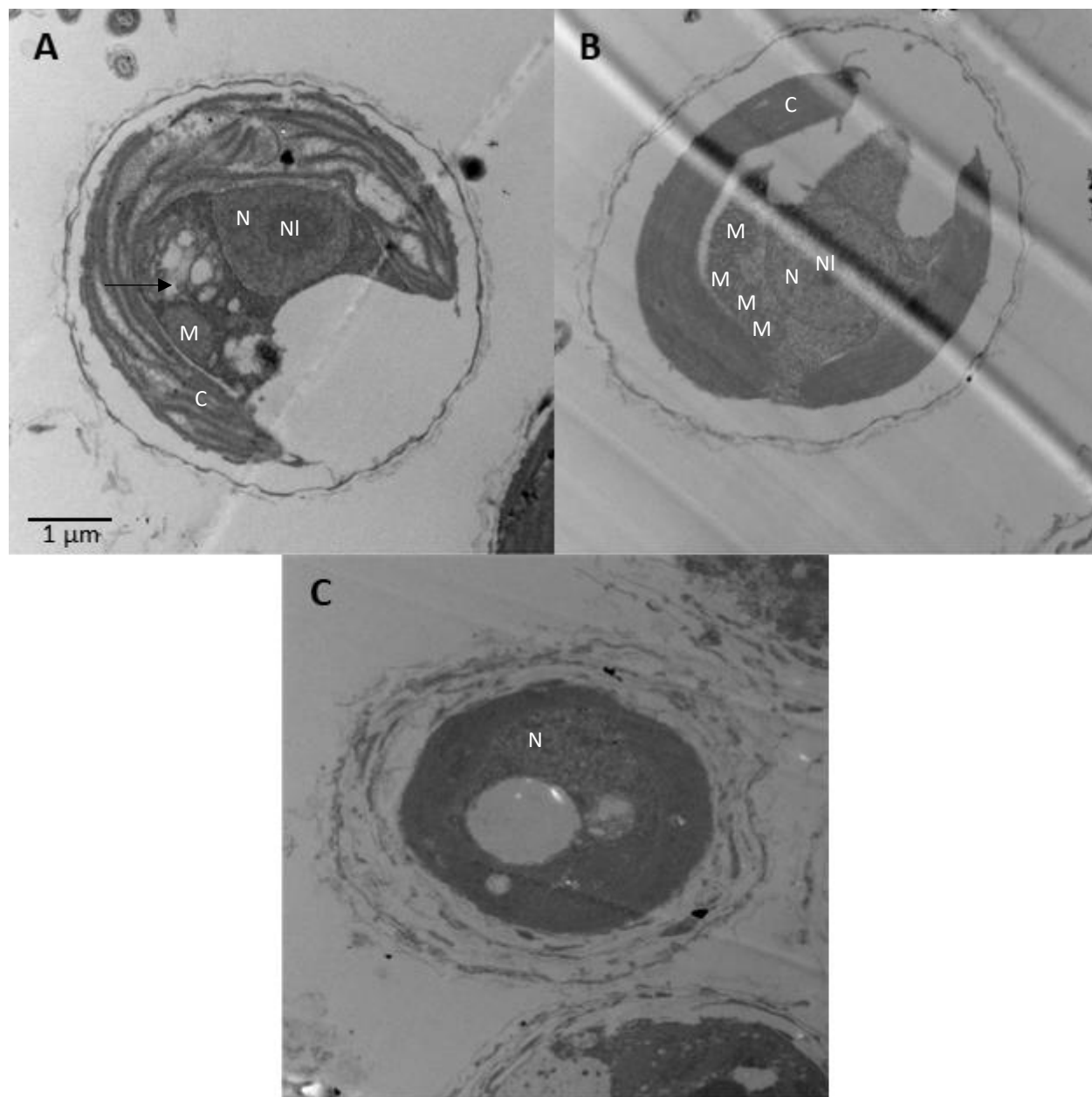
Al analizar *I. galbana*, las células del cultivo control y aquellas expuestas con  $Gd_2O_3: Yb/Er$  conservan su forma esférica o ligeramente ovalada (Fig. 9A y B). Sin embargo, las que estuvieron expuestas a NP TR tienen mayor cantidad de mitocondrias y el contenido celular se encuentra más separado de la membrana, en comparación con el control (Fig. 9B). Aun así, no se observa la presencia de gotas de lípidos, las cuales pueden ser usadas como mecanismo de supervivencia cuando las condiciones ambientales no son óptimas para el crecimiento (Roopnarain, Gray, and Sym 2014). Por otro lado, en los cultivos tratados con Zeolita: Ag la única estructura que se pudo identificar fue el núcleo, en el cuál no se encuentra definido el nucléolo (Fig. 9C). Con este tratamiento, se puede observar una región que podría corresponder al cloroplasto, sin embargo, no se encuentran presentes los tilacoides que se observan en el control y con el tratamiento con NP TR.

*C. muelleri* tienen forma cuadrada donde la mayor parte del volumen celular lo ocupan los cloroplastos. Las células que fueron expuestas a  $Gd_2O_3: Yb/Er$  conservaron su forma y la organización celular característica de esta especie (Fig. 10B). Tanto en el control como en las células tratadas con NP TR se observa la presencia de gotas de lípidos en los cloroplastos, aunque, en las células sin tratamiento, el acomodo de estos cuerpos es ordenado. La forma de las células que fueron tratadas con Zeolita: Ag se modificó a una rectangular, donde, se observan modificaciones de las estructuras celulares (Fig. 8C). La proporción de volumen que ocupa el cloroplasto fue visiblemente reducida, y estructuras como el núcleo, no pueden ser identificadas con precisión. Con este último tratamiento, no hay presencia de gotas de lípidos.

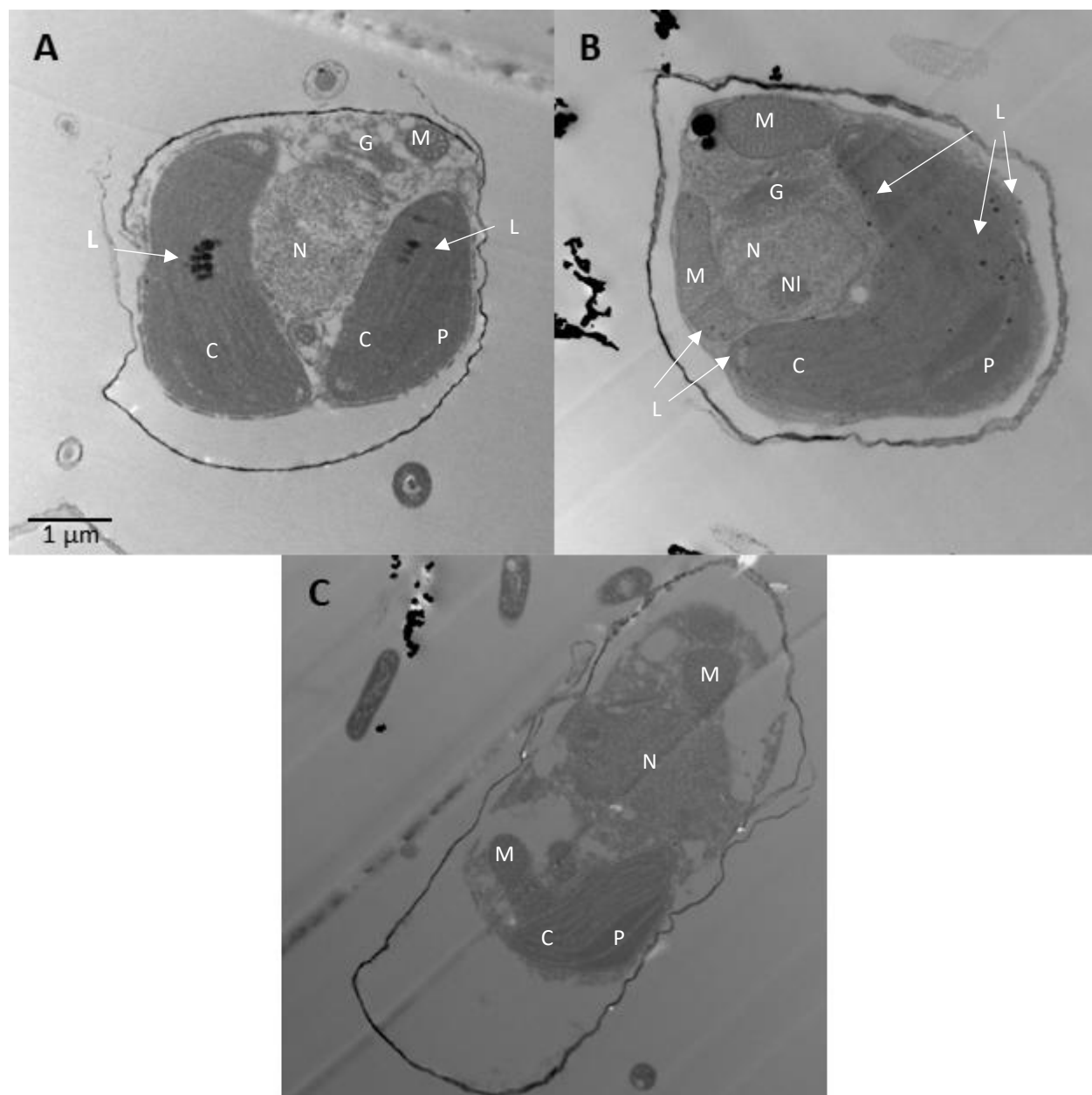
Los cultivos tratados con NP TR conservaron una forma y organización celular muy parecida a la del control. Mientras que la identificación de estas mismas estructuras fue difícil en las células tratadas con Zeolita: Ag. Por lo que, este último tratamiento resultó ser más dañino que los que contienen tierras raras, lo que es congruente con el resto de los resultados en este trabajo.



**Figura 8. Efecto de los NIB en la ultraestructura de *Dunaliella* sp.** *A* Control, *B*  $Gd_2O_3: Yb/Er$  y *C* YAG: Pr. Los cultivos se expusieron a  $100 \mu g mL^{-1}$  de los tratamientos por 24 horas. N, núcleo; NI, nucléolo; C, cloroplasto; P, pirenoide; PA, placa de almidón de pirenoide; A, almidón; L, gotas de lípidos.



**Figura 9. Efecto de los NIB en la ultraestructura de *Isochrysis galbana*.** **A** Control, **B** Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Yb/Er y **C** Zeolita: Ag. Los cultivos se expusieron a 100 µg mL<sup>-1</sup> de los tratamientos por 24 horas. N, núcleo; NI, nucléolo; C, cloroplasto; M, mitocondria.



**Figura 10. Efecto de los NIB en la ultraestructura de *Chaetoceros muelleri*. A Control, B  $Gd_2O_3: Yb/Er$  y C Zeolita: Ag. Los cultivos se expusieron a  $100 \mu g mL^{-1}$  de los tratamientos por 24 horas. N, núcleo; NI, nucléolo; C, cloroplasto; M, mitocondria; G, aparato de Golgi; P, pirenoide; L, gotas de lípidos.**

## Capítulo 4. Conclusiones

El trabajo experimental permitió evaluar los efectos de tres nanomateriales de interés biomédico en tres especies de microalgas marinas. Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primer trabajo en evaluar NP TR -consideradas no tóxicas en biomedicina- para predecir escenarios de riesgo ambiental en microalgas marinas.

Se reveló que tanto YAG: Pr como Zeolita: Ag pierden estabilidad al estar presentes en medio “f/2”, lo que los lleva a agregarse y precipitarse. Este comportamiento no se observa cuando están dispersos en agua destilada.

Además, se descubrió que *Dunaliella* sp. e *Isochrysis galbana* responden de manera similar a los tratamientos, mientras que los efectos siempre fueron más severos en *Chaetoceros muelleri*. En bajas concentraciones, las NP TR no representan un riesgo aparente para las especies de microalgas evaluadas, pero se necesitan más estudios. Por otro lado, incluso en la concentración más alta las NP TR resultaron tener efectos menos severos que Zeolita: Ag en el crecimiento de los cultivos, daño al material genético, la producción de ROS y de pigmentos fotosensibles, y alteraciones de morfología y ultraestructura.

Las concentraciones evaluadas son altas y poco probables de encontrarse en el ambiente en la actualidad. Sin embargo, el uso creciente de los nanomateriales y su uso indiscriminado podrían generar condiciones similares en el futuro.

Para futuros trabajos se propone: 1) Caracterizar a los nanomateriales en condiciones más complejas donde se puedan simular entornos naturales reales; 2) Evaluar los efectos de los tratamientos a distintos tiempos de exposición; 3) Realizar estudios que permitan evaluar bioacumulación y futura bioaumentación; 4) Investigar más sobre el efecto de nanomateriales considerados no tóxicos en biomedicina.



## Literatura citada

- Arredondo Vega, B.O. y Voltolina, D. 2017. Determinación de pigmentos totales por métodos espectrofotométricos. En: Arredondo Vega, B.O., Voltolina, D., Zenteno-Savin, T., Arce-Montoya, M. y Gómez-Anduro, G.A. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 2da edición. CIBNOR. 143 P.
- Balusamy, Brabu, Yamuna Gowri Kandhasamy, Anitha Senthamizhan, Gopalakrishnan Chandrasekaran, Murugan Siva Subramanian, and Tirukalikundram S. Kumaravel. 2012. "Characterization and Bacterial Toxicity of Lanthanum Oxide Bulk and Nanoparticles." *Journal of Rare Earths* 30 (12): 1298–1302. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(12\)60224-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(12)60224-5).
- Bérubé, Kelly A., John D. Dodge, and Tom W. Ford. 1999. "Effects of Chronic Salt Stress on the Ultrastructure of *Dunaliella Bioculata* (Chlorophyta, Volvocales): Mechanisms of Response and Recovery." *European Journal of Phycology* 34 (2): 117–23. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736172>.
- Bhattacharjee, Sourav. 2016. "DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not?" *Journal of Controlled Release* 235. Elsevier B.V.: 337–51. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- Bondarenko, Olesja, Katre Juganson, Angela Ivask, Kaja Kasemets, Monika Mortimer, and Anne Kahru. 2013. "Toxicity of Ag, CuO and ZnO Nanoparticles to Selected Environmentally Relevant Test Organisms and Mammalian Cells in Vitro: A Critical Review." *Archives of Toxicology* 87 (7): 1181–1200. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>.
- Campanella, L., F. Cubadda, M. P. Sammartino, and A. Saoncella. 2001. "An Algal Biosensor for the Monitoring of Water Toxicity in Estuarine Environments." *Water Research* 35 (1): 69–76. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00223-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00223-2).
- Chávez, Dalia H., Oscar E. Contreras, and Gustavo A. Hirata. 2016a. "Synthesis and Upconversion Luminescence of Nanoparticles  $Y_2O_3$  and  $Gd_2O_3$  Co-Doped with  $Yb^{3+}$  and  $Er^{3+}$ ."

*Nanomaterials and Nanotechnology* 6: 7. <https://doi.org/10.5772/62188>.

Dowling, a, R Clift, N Grobert, D Hutton, R Oliver, O O’neill, J Pethica, et al. 2004. “Nanoscience and Nanotechnologies : Opportunities and Uncertainties.” *London The Royal Society The Royal Academy of Engineering Report* 46 (July): 618–618. <https://doi.org/10.1007/s00234-004-1255-6>.

Gerber, Lukas C., Nadine Moser, Norman A. Luechinger, Wendelin J. Stark, and Robert N. Grass. 2012. “Phosphate Starvation as an Antimicrobial Strategy: The Controllable Toxicity of Lanthanum Oxide Nanoparticles.” *Chemical Communications* 48 (32): 3869–71. <https://doi.org/10.1039/c2cc30903c>.

Goecke, Franz, Celia Jerez, Vilém Zachleder, Felix Figueroa, Katerina Bisova, Tomas Rezanka, and Milada Vitova. 2015. “Use of Lanthanides to Alleviate the Effects of Metal Ion-Deficiency in *Desmodesmus Quadricauda* ( Sphaeropleales , Chlorophyta ).” *Frontiers in Microbiology* 6 (January): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00002>.

Goecke, Franz, Milada Vítová, Jaromír Lukavský, Linda Nedbalová, Tomáš Řezanka, and Vilém Zachleder. 2017. “Effects of Rare Earth Elements on Growth Rate, Lipids, Fatty Acids and Pigments in Microalgae.” *Phycological Research* 65 (3): 226–34. <https://doi.org/10.1111/pre.12180>.

Guiochin-Marín, Melissa Ailed. 2016. “Evaluación de La Toxicidad de Nanomateriales de Interés Biomédico.” Universidad de las Américas Puebla.

Gutiérrez, Jorge A., Silvia Caballero, Laura A. Díaz, M. Alejandra Guerrero, Jennifer Ruiz, and Claudia C. Ortiz. 2018. “High Antifungal Activity against *Candida* Species of Monometallic and Bimetallic Nanoparticles Synthesized in Nanoreactors.” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, [acsbomaterials.7b00511](https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00511). <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00511>.

Hazani, Amal A., Mohamed M. Ibrahim, Ibrahim A. Arif, Afaf I. Shehata, Gehan El-Gaaly, Mohamed Daoud, Dalia Fouad, Humaira Rizwana, and Nadine Moubayed. 2013. “Ecotoxicity of Ag-Nanoparticles to Microalgae.” *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7 (SPEC. ISS. NOVEMB): 233–41. <https://doi.org/10.2298/ABS1304447H>.

- He, Di, Juan José Dorantes-Aranda, and T David Waite. 2012. "Silver Nanoparticle  $\square$  Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects." *Environmental Science and Technology* 46: 8731–8738. <https://doi.org/10.1021/es300588a>.
- Instruments, Malvern. 2011. "Inform White Paper Dynamic Light Scattering." *Malvern*.
- Ivask, Angela, Imbi Kurvet, Kaja Kasemets, Irina Blinova, Villem Aruoja, Sandra Suppi, Heiki Vija, et al. 2014. "Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria , Yeast , Algae , Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro." *PLoS ONE* 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>.
- Jaime-Acuña, Oscar Eugenio, Anaid Meza-Villezcás, M Vasquez-Peña, Oscar Raymond-Herrera, H Villavicencio-García, Vitalii Petranovskii, Rafael Vazquez-Duhalt, and Alejandro Huerto-Saquero. 2016. "Synthesis and Complete Antimicrobial Characterization of CEOBACTER , an Ag- Based Nanocomposite." *PLoS ONE* 11 (11): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166205>.
- "Join the Dialogue." 2012. *Nature Nanotechnology* 7 (September): 545. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.150>.
- Katiyar, Richa, B. R. Gurjar, Shalini Biswas, Vikas Pruthi, Nalin Kumar, and Prashant Kumar. 2017. "Microalgae: An Emerging Source of Energy Based Bio-Products and a Solution for Environmental Issues." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 72 (October). Elsevier: 1083–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.028>.
- Klaine, Stephen J., Pedro J.J. Alvarez, Graeme E. Batley, Teresa F. Fernandes, Richard D. Handy, Delina Y. Lyon, Shaily Mahendra, Michael J. McLaughlin, and Jamie R. Lead. 2008. "Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate, Bioavailability, and Effects." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (9): 1825–51. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>.
- Kurvet, Imbi, Katre Juganson, Heiki Vija, Mariliis Sihtmäe, Irina Blinova, Guttorm Syvertsen-Wiig, and Anne Kahru. 2017. "Toxicity of Nine (Doped) Rare Earth Metal Oxides and Respective

- Individual Metals to Aquatic Microorganisms *Vibrio Fischeri* and *Tetrahymena Thermophila*." *Materials* 10 (7). <https://doi.org/10.3390/ma10070754>.
- Lara, Humberto H., Nilda V. Ayala-Núñez, Liliana del Carmen Ixtepan Turrent, and Cristina Rodríguez Padilla. 2010. "Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 (4): 615–21. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>.
- Lewinski, Nastassja, Vicki Colvin, and Rebekah Drezek. 2008. "Cytotoxicity of Nanoparticles." *Small* 4 (1): 26–49. <https://doi.org/10.1002/sml.200700595>.
- Li, Yang, Ying Liu, Yujian Fu, Taotao Wei, Laurent Le Guyader, Ge Gao, Ru Shi Liu, Yan Zhong Chang, and Chunying Chen. 2012. "The Triggering of Apoptosis in Macrophages by Pristine Graphene through the MAPK and TGF-Beta Signaling Pathways." *Biomaterials* 33 (2). Elsevier Ltd: 402–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.091>.
- Lilley, R, A Goyal, T Marengo, and A D Brown. 1987. "The Response of *Dunaliella* to Salt Stress: A Comparison of Effects on Photosynthesis, and on the Intracellular Levels of the Osmoregulatory Solute Glycerol, the Adenine Nucleotides and the Pyridine Nucleotides." *Progress in Photosynthesis Research* 4: 193–96. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-0519-6\\_42](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-0519-6_42).
- Malik, Maqsood Ahmad, Mohmmad Younus Wani, Mohd Ali Hashim, and Firdosa Nabi. 2011. "Nanotoxicity: Dimensional and Morphological Concerns." *Advances in Physical Chemistry* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/450912>.
- Marquis, Bryce J., Sara A. Love, Katherine L. Braun, and Christy L. Haynes. 2009. "Analytical Methods to Assess Nanoparticle Toxicity." *The Analyst* 134 (3): 425. <https://doi.org/10.1039/b818082b>.
- Maynard, A D. 2006. "Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk." *Woodrow Wilson International Center for Scholars*, no. July: 43. <http://www.cst.gov.uk/assets/cst/docs/files/nano-review/ww5.pdf>.

- McNamara, Karrina, and Syed A. M. Tofail. 2017. "Nanoparticles in Biomedical Applications." *Advances in Physics: X* 2 (1). Taylor & Francis: 54–88. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1254570>.
- Miazek, Krystian, Waldemar Iwanek, Claire Remacle, Aurore Richel, and Dorothee Goffin. 2015. "Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10): 23929–69. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>.
- Morones, Jose Ruben, Jose Luis Elechiguerra, Alejandra Camacho, Katherine Holt, Juan B. Kouri, Jose Tapia Ramírez, and Miguel Jose Yacaman. 2005. "The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles." *Nanotechnology* 16 (10): 2346–53. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
- Navarro, Enrique, Flavio Piccapietra, Bettina Wagner, Fabio Marconi, Ralf Kaegi, Niksa Odzak, Laura Sigg, and Renata Behra. 2008. "Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Environmental Science and Technology* 42 (23): 8959–64. <https://doi.org/10.1021/es801785m>.
- Oberdörster, Günter, Eva Oberdörster, and Jan Oberdörster. 2005. "Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles." *Environmental Health Perspectives* 113 (7): 823–39. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>.
- Prasad, Paras N. 2012. *Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering*. First. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Raman, Gurusamy, Seon Joo Park, Natarajan Sakthivel, and Anil K. Suresh. 2017. "Physico-Cultural Parameters during AgNPs Biotransformation with Bactericidal Activity against Human Pathogens." *Enzyme and Microbial Technology* 100. Elsevier Inc.: 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.02.002>.
- Re, F., R. Moresco, and M. Masserini. 2012. "Nanoparticles for Neuroimaging." *Journal of Physics D: Applied Physics* 45 (7). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/7/073001>.

- Rezanka, Tomas, Katrin Kaineder, Dana Mezricky, Michal Mezricky, Katerina Bisova, Vilém Zachleder, and Milada Vitova. 2016. "The Effect of Lanthanides on Photosynthesis , Growth , and Chlorophyll Profile of the Green Alga *Desmodesmus Quadricauda*." *Photosynthesis Research* 130 (1–3): 335–46. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0263-9>.
- Ribeiro, Fabianne, Julián Alberto Gallego-urrea, Kerstin Jurkschat, Alison Crossley, Martin Hassellöv, Cameron Taylor, Amadeu M V M Soares, and Susana Loureiro. 2014. "Science of the Total Environment Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Induce High Toxicity to *Pseudokirchneriella Subcapitata* , *Daphnia Magna* and *Danio Rerio*." *Science of the Total Environment*, *The* 466–467. Elsevier B.V.: 232–41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>.
- Roopnarain, Ashira, Vincent M Gray, and Stuart Sym. 2014. "Influence of Nitrogen Stress on *Isochrysis Galbana* Strain U4 , a Candidate for Biodiesel Production." *Phycological Research* 62 (December 2013): 237–49. <https://doi.org/10.1111/pre.12054>.
- Sengar, Prakhar, G. A. Hirata, Mario H. Farias, and Felipe Castellón. 2016. "Morphological Optimization and (3-Aminopropyl) Trimethoxy Silane Surface Modification of Y3Al5O12:Pr Nanoscintillator for Biomedical Applications." *Materials Research Bulletin* 77. Elsevier Ltd: 236–42. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2016.01.045>.
- Shrivastava, Siddhartha, Tanmay Bera, Arnab Roy, Gajendra Singh, P. Ramachandrarao, and Debabrata Dash. 2007. "Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Novel Silver Nanoparticles." *Nanotechnology* 18 (22). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/22/225103>.
- Tai, Peidong, Qing Zhao, Dan Su, Peijun Li, and Frank Stagnitti. 2010. "Biological Toxicity of Lanthanide Elements on Algae." *Chemosphere* 80 (9). Elsevier Ltd: 1031–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.030>.
- Tang, Yulin, Huaijia Xin, Feng Yang, and Xin Long. 2018. "A Historical Review and Bibliometric Analysis of Research on Estuary Pollution." *Journal of Nanoparticle Research* 20 (92). *Journal of Nanoparticle Research*: 91–92. <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4196-4>.

“The Dose Makes the Poison.” 2011. *Nature Nanotechnology* 6 (June): 329.

Usher, Philippa K., Andrew B. Ross, Miller Alonso Camargo-Valero, Alison S. Tomlin, and William F. Gale. 2014. “An Overview of the Potential Environmental Impacts of Large-Scale Microalgae Cultivation.” *Biofuels* 5 (3): 331–49. <https://doi.org/10.1080/17597269.2014.913925>.

Vance, Marina E., Todd Kuiken, Eric P. Vejerano, Sean P. McGinnis, Michael F. Hochella, and David Rejeski Hull. 2015. “Nanotechnology in the Real World: Redeveloping the Nanomaterial Consumer Products Inventory.” *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6 (1): 1769–80. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>.

Vazquez-muñoz, Roberto, Belen Borrego, Karla Juárez-moreno, Maritza García-garcía, Josué D Mota, Nina Bogdanchikova, and Alejandro Huerta-saquero. 2017. “Toxicity of Silver Nanoparticles in Biological Systems : Does the Complexity of Biological Systems Matter ?” *Toxicology Letters* 276 (April). Elsevier: 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.007>.

Vidussi, Francesca, Hervé Claustre, José Bustillos-Guzmán, Caroline Cailliau, and Jean-Claude Marty. 1996. “Determination of Chlorophylls and Carotenoids of Marine Phytoplankton: Separation of Chlorophyll *a* from Divinylchlorophyll *a* and Zeaxanthin from Lutein.” *Journal of Plankton Research* 18 (12): 2377–82. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.12.2377>.

Weissig, Volkmar, Tracy K. Pettinger, and Nicole Murdock. 2014. “Nanopharmaceuticals (Part 1): Products on the Market.” *International Journal of Nanomedicine* 9: 4357–73. <https://doi.org/10.2147/IJN.S46900>.

Wypij, Magdalena, Joanna Czarnecka, Hanna Dahm, Mahendra Rai, and Patrycja Golinska. 2017. “Silver Nanoparticles from *Pilimelia Columellifera* Subsp. *Pallida* SL19 Strain Demonstrated Antifungal Activity against Fungi Causing Superficial Mycoses.” *Journal of Basic Microbiology* 57 (9): 793–800. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700121>.

Yang, Shao, Rudolf S S Wu, and Richard Y C Kong. 2002. “Physiological and Cytological Responses of the Marine Diatom *Skeletonema Costatum* to 2, 4-Dichlorophenol.” *Aquatic Toxicology*

60: 33–41. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00258-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00258-2).