

FITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN ESPECIES VEGETALES DE INTERÉS ALIMENTARIO Y COMERCIAL EN LA REGIÓN DEL BAJÍO

Arias García-Francisco Ituriel (1), De La Rosa Álvarez-Ma. Guadalupe (2)

1 [Ingeniería Química Sustentable, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ariasituriel@gmail.com]

2 [Departamento de Ingenierías Química, Biomédica Y Electrónica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [gdelarosa@fisica.ugto.mx]

Resumen

En la actualidad existen materiales de gran interés de estudio debido a su tamaño y a las aplicaciones que pueden tener debido a sus propiedades. Podemos señalar los nanomateriales, que pese a sus múltiples usos, se desconocen muchos de sus efectos en los organismos vivos. Debido a esto, la nanoecotoxicología ha surgido para proporcionar información sobre los efectos negativos de estos materiales en las plantas debido a la gran importancia de éstas en la vida diaria de estos organismos. Por ello, en el presente trabajo se estudiaron algunos de los efectos de las nanopartículas (NP's) sobre plantas de gran interés alimentario y comercial en la zona del bajío. El efecto de NP's de ZnO se determinó en plantas de girasol analizando su aspecto, el porcentaje de germinación, el crecimiento de raíz y tallo, así como su composición química por medio de técnicas espectrofotométricas como Fluorescencia de Rayos X (XRF) y Tomografía Coherente Óptica (OCT). Los resultados indicaron que conforme se aumentó la concentración de las NP's, la intensidad del pico de Zn en XRF aumentó, probablemente indicando que la planta absorbe las NP's. Dicha absorción puede ser explicada por medio de la técnica OCT donde se apreció una saturación de la señal debido al metal presente. Sin embargo, a altas concentraciones el efecto en el crecimiento era negativo.

Abstract

Now days, there is an increasing interest in nanomaterials due to their size and the application that they could have due to their properties. Despite its wide range of uses, the effects that they could have on the living organisms are still unknown. There for, a new field of research has emerged to obtain all this information, this new field is call nanoecotoxicology and its particular interest are the effects of these materials on plants due to the importance in daily life of organisms. There for, in this research we studied some of the effects that nanomaterials (NM's), especially nanoparticles (NP's), had on plants of great interest in the area. All these effects were measured on sunflower plants using NP's of ZnO at different concentration analyzing their physical and chemical aspect with the help of X Ray Fluorescence spectroscopy (XRF) and Optical Coherence Tomography (OCT). As we increased the concentration of the NP's, we could appreciate how the plant absorbed these materials as we saw it with the help of XRF. This absorption can be explained with the help of the OCT technique, where we appreciated saturation on the signal due to the metal in the plant. At the end, we could see that in high concentration they affected their grown.

Palabras Clave

Nanomateriales, ambiental, fitotoxicidad, nanopartículas, espectroscopia.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la nanociencia se ha convertido en una de las áreas prioritarias en el desarrollo científico y tecnológico. La Nanotecnología tiene su fundamento en el estudio de los fenómenos ocurridos en la nanoescala y en los llamados nanomateriales (NM's).^[3]

Los NM's son una nueva clase de materiales en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentran dentro del rango de 1 y 100 nm. De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren dentro del régimen nanométrico la clasificación que se le dará. Nosotros nos enfocaremos en la dimensión cero donde sus tres dimensiones se encuentran dentro del rango nanométrico, tal es el caso de las NP's.

Aunque en las últimas décadas ha surgido gran interés por el estudio de estos materiales, estos ya existían desde siglos atrás.

Las NP's específicamente, han existido en el planeta por siglos y son utilizados con mayor frecuencia las metálicas debido a que poseen propiedades interesantes con aplicaciones en diversas áreas tecnológicas.^[4]

Un ejemplo son las NP's de ZnO, las cuales tienen una gran gama de aplicaciones biológicas como sensores y marcadores biológicos, liberadores de fármacos; y tecnológicas como celdas solares, fotocatalíticas, fotoluminiscentes y sensores. Podemos destacar sus propiedades de bloqueo de rayos ultravioleta (UV).^[6]

En los últimos años, el uso de la nanotecnología ha incrementado de forma significativa. Al mismo tiempo que estos materiales son introducidos al mercado se genera la formación de residuos que presentan una forma de contaminación al medio ambiente. Mediante procesos de biomagnificación y bioacumulación, dichos residuos entran en la cadena trófica, entrando en contacto con organismos vivos como el hombre. Actualmente existe poca información acerca del destino, transporte e impacto de estos materiales en la salud humana y en el ambiente. Con base a esto se han creado centros de investigación dedicados al estudio de la toxicología de la nanotecnología a fin de que estos procesos sean más seguros para el hombre y el medio ambiente. Por ello, el

presente trabajo pretende aportar conocimientos en el área de la nanotoxicología, específicamente utilizando como modelos plantas de girasol. La información obtenida podrá servir en un futuro para la elaboración de políticas públicas para el manejo de estos materiales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto de la presencia de NP's metálicas en la germinación y crecimiento del girasol

Se prepararon suspensiones de 0, 50, 100, 400, 800 y 1600 ppm, usando las NP's de ZnO previamente preparadas, las cuales se sonificaron para asegurar que se disolvieran de acuerdo al trabajo de Lin y Xing.^[5]

En un ambiente estéril se coloraron 30 semillas en el fondo una caja *Petri* sobre un papel filtro con 2.5mL de la suspensión de NP's, se cubrieron con un segundo papel filtro, se adicionó 2.5mL de la suspensión y 10 gotas de una solución antibiótica-antimicótica al 10%. Se envolvieron con papel aluminio y se dejaron en un cuarto a 20°C por 8 días. Esto se realizó para cada una de las suspensiones de NP's y por triplicado.

Al término del tiempo se midieron las plántulas obtenidas de cada tratamiento con apoyo de un Vernier, midiendo la parte correspondiente al tallo y la raíz. Al obtener todas las medidas de las plántulas se realizó un análisis estadístico ANOVA comenzando con la hipótesis nula de que las NP's no tuvieron efecto en el crecimiento de las plántulas. Se calculó el porcentaje de germinación (%G) usando la ecuación (1), el porcentaje de germinación relativa (%RG) usando la ecuación (2) y el cambio de germinación (%GC) usando la ecuación (3).

$$\%G = \frac{\text{No. de semillas germinadas}}{\text{No. total de semillas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%RG = \frac{\%G \text{ en tratamiento}}{\%G \text{ en control}} \times 100 \quad (2)$$

$$\%GC = \%RG \text{ en tratamiento} - \%RG \text{ en control} \quad (3)$$

Se seleccionaron 10 tallos y 10 raíces de cada tratamiento, se coloraron en sobres y se introdujeron en un horno a 70°C por dos días.

Cuantificación de Zn en tejido de plántula seca

La cuantificación de Zn en los tejidos de plántula se realizó por medio de espectroscopia de Fluorescencia de Rayos X (XRF) con un equipo de Epsilon 3XLE. Con los tallos y raíces secas, se seleccionaron aleatoriamente un tallo y una raíz de cada tratamiento. La muestra seleccionada fue colocada en un portaobjetivos de silicio y se introdujo en el equipo para analizar su composición elemental. Una vez obtenida se usó como base para analizar el resto de las muestras bajo el mismo esquema.

Análisis del efecto de las NP's en tejido de plántula fresca por Tomografía de Coherencia Óptica

Se realizó por la técnica de Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, por sus siglas en inglés) observando los tejidos de plántulas frescas del control, 400, 800 y 1600 ppm de las NP's de ZnO para determinar el lugar donde se depositaron las NP's a lo largo del tejido. Para un análisis más detallado se realizaron cortes transversales de los controles de la muestra de 1600 ppm uno al lado del otro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la presencia de NP's metálicas en la germinación y crecimiento del girasol

Al realizar los cálculos de los datos se determinó un valor de distribución F, tanto para la raíz como para el tallo y se obtuvieron los valores de 6.6540 y 8.4059, respectivamente. Para la prueba F se utilizaron valores de confiabilidad desde 0.1 hasta 0.001, obteniendo un valor en la prueba de 3.78. Este valor es menor a la distribución por lo que por medio del gráfico de Fisher y con base en los cálculos, podemos rechazar la hipótesis nula, es decir, las NP's sí tuvieron un efecto en el crecimiento de la plántula. [1] Por medio del método de Tukey se determinó que tratamiento tuvo mayor efecto en la germinación, obteniendo los agrupamientos mostrados en la imagen 1 para la

raíz y la 2 para el tallo. En la imagen 1 podemos apreciar que los tratamientos con concentraciones de 200 y 800 ppm disminuye el crecimiento de la raíz con respecto al control obteniendo el último agrupamiento. Por otra parte, las concentraciones de 50, 100 y 400 ppm favorecieron el crecimiento de la raíz. De acuerdo a la imagen 5, los tratamientos que impidieron el crecimiento fueron los de 100 y 800 ppm.

En los tratamientos hubo plántulas que se consideraron como no germinadas de acuerdo Brevis Acuna [2], donde se considera como germinadas aquellas plántulas cuyo tallo fuera mayor a 5 mm. Con base en esto se obtuvo el %G, %RG y %GC de cada uno de los tratamientos, los cuales se muestran en la tabla 1. El signo positivo de %GC indica que este parámetro mejoró la velocidad de germinación de la plántula, esto se observó en la mayoría de los tratamientos a

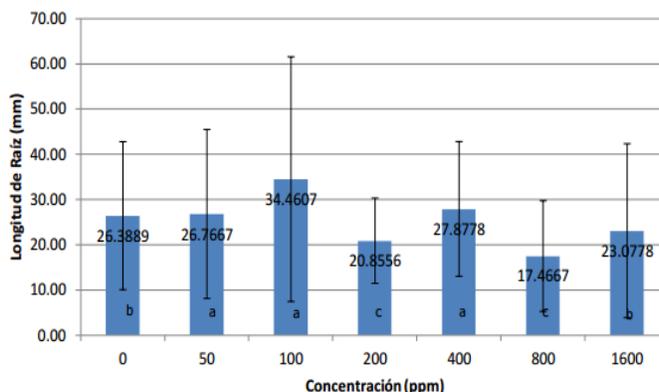


IMAGEN 1: Análisis obtenido a partir del método Tukey donde se muestra los agrupamientos en orden al impacto que tuvieron las diferentes concentraciones de NP's en el crecimiento de la raíz.

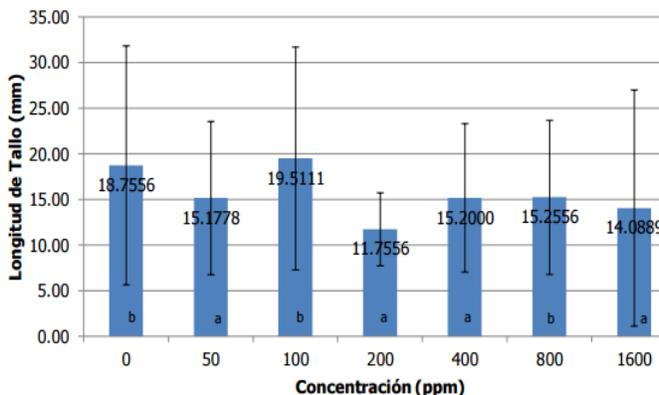


IMAGEN 2: Análisis obtenido a partir del método Tukey donde se muestra los agrupamientos en orden al impacto que tuvieron las diferentes concentraciones de NP's en el crecimiento del tallo.

excepción de 100 y 1600 ppm.

Tabla 1.

Tratamiento (ppm)	Porcentaje de Germinación (%)	Porcentaje de Germinación Relativa (RG%)	Porcentaje de Cambio en Germinación (GC%)
0	90.00	100	0
50	94.44	104.94	4.94
100	88.89	98.77	-1.23
200	94.44	104.94	4.94
400	93.33	103.70	3.70
800	91.11	101.23	1.23
1600	74.44	82.72	-17.28

Cuantificación de Zn en tejido de plántula seca

La base con la que se analizó cada una de las muestras fue obtenida a partir del análisis de la raíz y del tallo de control, de los elementos que dieron mayor número de cuentas, es decir, mayor señal. En la imagen 3 y 4, se muestran los resultados obtenidos de este análisis en la raíz y el tallo, respectivamente. Como podemos observar, conforme aumenta la concentración de las NP's, se observa que la señal del Zn también va aumentando por lo que la plántula va absorbiendo mayor cantidad de Zn. Los tratamientos donde ocurre lo contrario son los de 100 y 1600 ppm. Esto debido que posiblemente las NP's no permitieron el crecimiento de la plántula, así evitando que absorbiera mayor cantidad de Zn y tuvieran un comportamiento hormesis.

Análisis del efecto de las NP's en tejido de plántula fresca por Tomografía de Coherencia Óptica

La técnica OCT nos permitió observar los tejidos de la plántula seca y ver si efectivamente la NP se encontraba en estos mediante una imagen. Si bien, esta técnica no nos dio una imagen detallada

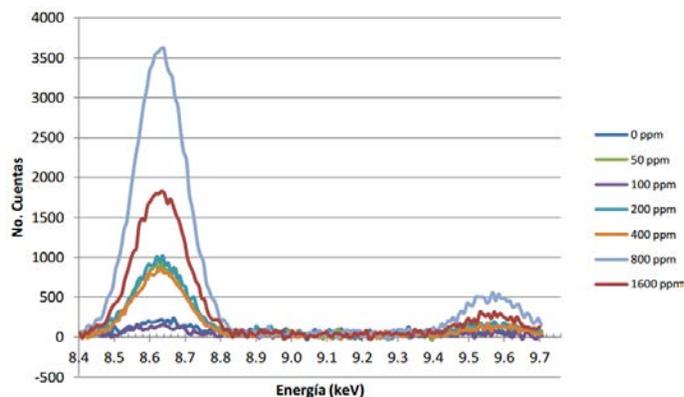


IMAGEN 3: Análisis realizado por XRF en una muestra seca de raíz de una plántula de girasol donde se observa la variación del Zn a diferentes concentraciones de NP's con base a sus picos $K_{\alpha 1}$ a 8.6 keV y $K_{\beta 1}$ a 9.4 keV

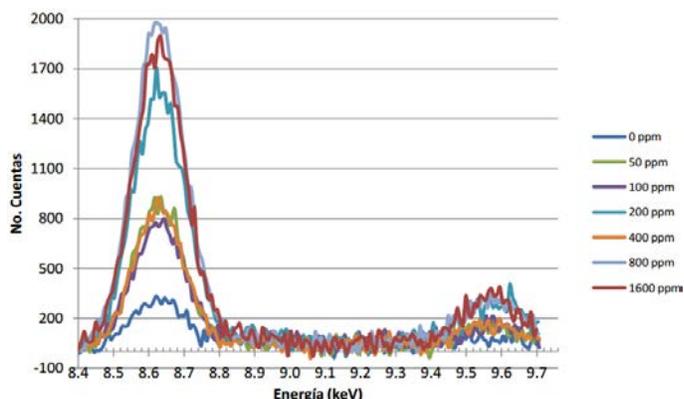


IMAGEN 4: Análisis realizado por XRF en una muestra seca del tallo de una plántula de girasol donde se observa la variación del Zn a diferentes concentraciones de NP's con base a sus picos $K_{\alpha 1}$ a 8.6 keV y $K_{\beta 1}$ a 9.4 keV

de la NP, ya que no permite ver estructuras de este orden. Sin embargo, sí nos permitió observar donde se encontraban las NP's en el tejido de la plántula, dado que esta técnica nos permite realizar cortes de la muestra y ver el interior de ésta. En las imágenes 5 y 6 podemos observar los resultados obtenidos para la raíz y el tallo, respectivamente.

La imagen 6 a), corresponde al análisis del tratamiento de control del tallo, observamos que los tejidos de la plántula se pueden apreciar pero no se ven continuos y se ven algo borrosos. Además, podemos apreciar la profundidad con la que penetró el haz es relativamente grande. En la imagen 6 b) observamos que los tejidos de la plántula se ven más continuos y con mayor brillo, esto debido a que las NP's intensifican las señales de estos, además de que la profundidad de penetración del haz es menor, en comparación

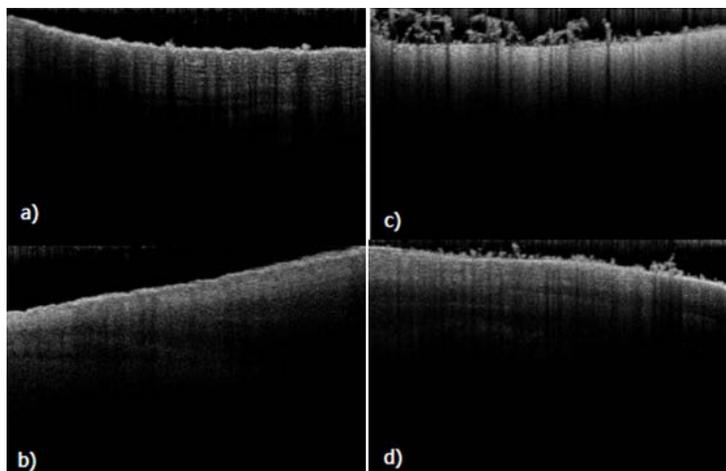


IMAGEN 5: Análisis realizado por la técnica OCT donde se aprecia la variación de absorción de Zn en los tejidos de la raíz a diferentes concentraciones de NP's: a) 0 ppm, b) 400 ppm, c) 800 ppm y d) 1600 ppm. Al comparar las imágenes podemos observar como la señal se va haciendo más clara y continua conforme se aumenta la concentración de las NP's.

con la del control debido a una saturación de las señales. Esta saturación se debe a la presencia de metal. Esto nos indica que las NP's se depositaron a lo largo del tejido de la plántula. Si analizamos cada imagen, conforme va aumentando la concentración de las NP's en la plántula tanto para la raíz como para el tallo, se va observando este efecto de mayor continuidad en los tejidos, mayor brillo de estos y menor profundidad del haz en la muestra.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos podemos observar que las NP's sí tuvieron un efecto en las plántulas, desde su germinación hasta su crecimiento tanto en tallo como raíz en los límites de las concentraciones empleadas; además de que se depositaron a lo largo de todo el tejido de la plántula.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por su apoyo al proyecto 403/2014. A la Dra. Ma. Guadalupe De La Rosa por su apoyo para que este proyecto se llevará a cabo. A la División de Ciencias e Ingenierías (DCI), Campus León y el Centro de Investigación en Óptica (CIO)

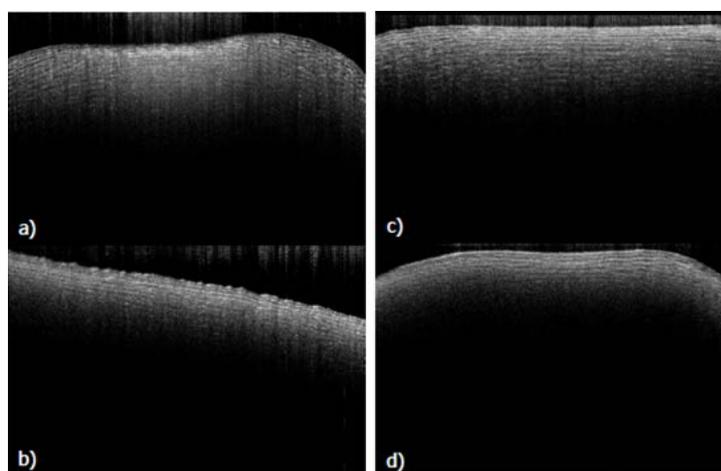


IMAGEN 6: Análisis realizado por la técnica OCT donde se aprecia la variación de absorción de Zn en los tejidos del tallo a diferentes concentraciones de NP's: a) 0 ppm, b) 400 ppm, c) 800 ppm y d) 1600 ppm. Al comparar las imágenes podemos observar como la señal se va haciendo más clara y continua conforme se aumenta la concentración de las NP's

por el apoyo con el uso de sus instalaciones para llevar a cabo los experimentos, al igual que su persona dentro de estas instalaciones.

REFERENCIAS

Libro:

[1] DeVore, Jay L. (2005). Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias. Ciudad: México Editorial Thomson (6a ed.) Capítulo 14. Análisis de Varianza, pg. 411-430.

Artículo:

[2] BREVIS ACUNA, PATRICIO. Efecto de tratamiento pregerminativo sobre la germinación de semillas de *Eucryphia glutinosa* (Poepp. et Endl.) Baillon. *Bosque (Valdivia)* [online]. 2003, vol.24, n.2 [citado 2015-07-13], pp. 79-84. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002003000200009&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-9200.

[3] GUTIERREZ WING, CLAUDIA E., Las Nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial, ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tienen? [online].

[4] LÓPEZ MORENO-MARTHA, DE LA ROSA ÁLVAREZ-GUADALUPE et al. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of Zn and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. *Environmental Science & Technology*, 2010, vol.44.

[5] LIN-D and XING-B, Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed and root growth. *Environ Pollut*, Vol. 150, No.2, 2007.

[6] VASEEM-MOHAMMAD, UMAR.AHMAD et al., ZnO Nanoparticles: Growth, Properties and Application. *Metal Oxide Nanostructures and their Applications*, Vol. 5, 2010.