

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



TOXICIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO
EN OSTIÓN JAPONÉS (*Crassostrea gigas*)

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

VICTORIA PAOLA CABRERA MADERA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. JUNIO, 2013.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

TOXICIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO
EN OSTIÓN JAPONÉS (*Crassostrea gigas*)

TESIS

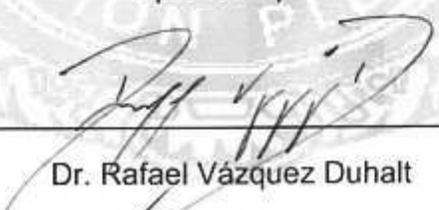
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

VICTORIA PAOLA CABRERA MADERA

Aprobado por:



Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Director de tesis



Dra. María Teresa Viana Castrillón

Sinodal



Dr. Gustavo Hirata Flores

Sinodal

RESUMEN de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, que presenta **VICTORIA PAOLA CABRERA MADERA** como requisito parcial para su titulación al posgrado de **ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**. Ensenada, Baja California. Junio 2013.

TOXICIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO EN OSTIÓN JAPONÉS **(*Crassostrea gigas*)**

Los nanotubos de carbono (NTC) son uno de los nanomateriales más utilizados, tanto en la industria como en aplicaciones biomédicas. Como en el caso de otros nanomateriales, su uso extendido plantea dudas acerca de los efectos que pudiera tener su liberación al medio ambiente, especialmente en ecosistemas acuáticos. Existe cada vez más información sobre los efectos citotóxicos de las nanopartículas en mamíferos, sin embargo, la información sobre su efecto en organismos invertebrados es escasa. Se ha reportado que la mayoría de los nanomateriales tienen un efecto tóxico superior en organismos acuáticos ya que la dispersión en medio acuoso favorece la absorción-bioacumulación de éstos y otros compuestos. El objetivo de este trabajo es estudiar el estrés oxidativo causado por nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) en el ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Se realizó un bioensayo con juveniles de ostión japonés (6.44 ± 0.49 cm) sometidos a 0 y 20 ppm de nanotubos de MWCNT durante 48 horas, en peceras individuales por triplicado. Cada pecera contenía 5 organismos en 12.5 L de agua de mar a una temperatura de 17.5 ± 0.36 °C, un pH de 7.8 ± 0.10 y oxígeno disuelto de 7.6 ± 0.15 mg/mL, las cuales están dentro de las condiciones óptimas para el mantenimiento de este organismo. Al finalizar este periodo se tomaron muestras de branquias, gónadas, glándula digestiva, manto y músculo abductor para ser analizados. El estrés oxidativo se cuantificó evaluando la peroxidación de lípidos siguiendo el protocolo de Nourooz-Zadeh et al. (1993) y cuantificando la oxidación de proteínas mediante el protocolo descrito por Oberdörster (2004). Los valores obtenidos fueron normalizados con base en los de proteínas totales, cuantificadas mediante la técnica de Bradford. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía (95%) y la prueba de Tukey para explorar diferencias entre datos, utilizando el paquete estadístico de Sigma Stat® Versión 3.5. Los resultados mostraron que la exposición a 20 ppm de MWCNT no causó una alteración en la concentración de lipoperóxidos o peróxidos lipídicos, dado que los valores de éstos, se mantuvieron en el rango normal para el ostión japonés. Solo se encontró diferencia estadísticamente significativa en la glándula digestiva y el músculo aductor con respecto a los controles sin la presencia de nanotubos. En los otros tejidos analizados no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, comparado con los controles. Por otro lado, para evaluar la oxidación de proteínas en los tejidos, se cuantificó

el contenido de carbonilos por microgramo de proteína total. No se detectó diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ni entre tejidos. La baja peroxidación de lípidos y la baja oxidación de proteínas encontrada en los tratamientos en presencia de nanotubos en el ostión japonés podrían estar relacionadas con un sistema antioxidante eficiente del organismo. Como podrían ser altas actividades de enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa. Si se considera que los ostiones son organismos filtradores y que han estado expuestos siempre a nanopartículas naturales, no es sorprendente que hayan podido o debido desarrollar sistemas de protección que contiendan contra los potenciales efectos de las nanopartículas. Razón que explica el por qué los ostiones han sido utilizados como bioindicadores de contaminación acuática, sobre todo de metales pesados, y dado su potente sistema antioxidante no podrían ser utilizados para biomonitorrear nanocompuestos dispersos en los cuerpos acuáticos.

ABSTRACT of Master in Sciences thesis by **VICTORIA PAOLA CABRERA MADERA**, as a partial requirement to obtain the degree in **MOLECULAR ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California. June 2013.

TOXICITY OF CARBON NANOTUBES IN JAPANESE OYSTER

(Crassostrea gigas)

Carbon nanotubes (CNT) are among the most widely used nanomaterials in industry and biomedical applications. As in the case of all nanomaterials, its use raises questions about the possible effects of the release of nanocomposites to environmental, particularly in aquatic ecosystems. There is increasing information on the cytotoxic effects of nanoparticles in mammals; however, the information on the effect of nanoparticles on invertebrate organisms is scarce. It has been reported that most nanomaterials have a higher toxic effect on aquatic organisms due to their solubility and dispersion in aqueous medium that facilitate the absorption-bioaccumulation. The aim of this work was to study the oxidative stress responses generated by multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) in Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). With this purpose, juvenile Japanese oysters (6.44±.49 cm) were exposed to 0 and 20 ppm MWCNT for 48 hours in individual tanks per triplicate. Each tank contained 5 organisms in 12.4 L of sea water a temperature of 17.5 ± 0.36 °C, pH 7.8 ± 0.10 and dissolved oxygen of 7.6 ± 0.15 mg / mL. Optimal conditions for the maintenance of this organism. After 48 hours, gills, gonads, digestive gland, mantle and adductor muscle tissues were dissected. Oxidative stress was estimated as the oxidation of protein and lipid peroxidation according to Nourooz-Zadeh et al. (1993) and Oberdörster (2004), respectively. These values were normalized based on the total proteins quantified by Bradford method. Statistical analysis (one-way ANOVA (95%) and the Tukey test) was performed using Sigma Stat ® Version 3.5. MWCNT exposure did not cause any major disturbances in lipoperoxides content and the values remained in the normal range for Pacific Oyster. Only a significant difference in digestive gland and abductor muscle in 20 ppm MWCNT treatment was found. Protein oxidation was measured in tissues as the carbonyl content per microgram of total protein. No significant differences in the various tissues from treated organisms could be found, when compared to the control organisms. The low production of lipoperoxides and carbonyls in control treatments seems to be related with their efficient antioxidant system, Therefore the oysters are currently used as bioindicators of water pollution, especially of heavy metals. It is concluded that due to their antioxidant system, the Japanese oyster cannot be used as

biomarker for biomonitoring nanocomposites in water bodies. Further research could be focused on the potent antioxidant system of oysters, mainly catalase.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y maestro, Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Gracias por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por presentarme un área del conocimiento totalmente nueva. Por expandir mis horizontes científicos.

A usted, lo saludo como Dante a Virgilio: ¡Salve maestro, guía y amigo!

A mi asesora y maestra, Dra. María Teresa Viana Castrillón

Le agradezco profundamente permitirme pertenecer a su laboratorio, integrarme como un alumno más y apoyarme en distintas maneras como le fue posible, tanto académica como personalmente. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Gustavo Hirata

Miembro de mi comité tutorial, que me dio su mano amiga y contribuyó con sus conocimientos y experiencia durante la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Nutrición y Fisiología de Organismos Acuáticos, en especial al *Dr. Gabriel Correa*, a la *M.C. Griselda Parés* y al *C. Roberto Preza Ponce*, por su apoyo en los detalles técnicos que necesité al montar el experimento.

A los amigos que hice en el Laboratorio de Nutrición, por facilitarme el ingreso a un área completamente diferente y brindarme el calor de su amistad. En especial a *Edith Carpio, Fernando Barreto, Daniel Badillo y Jaime García* que me dieron valiosos consejos sobre cómo realizar un experimento con organismos vivos y cómo manejar a los ostiones.

A la empresa Acuicultura Integral S.A. de C.V., de la ciudad de Ensenada, por ser tan amables de facilitarnos los organismos con los que se experimentó, especialmente a *Roger Friaiz Díaz*, por los consejos para el cuidado y manejo de los mismos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (410938) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Ecología Molecular y Biotecnología.

DEDICATORIAS

A mis Padres, Alonso y Marcela.

Por dejarme volar y darme un motivo para volver siempre a Casa. Su Amor.

A mis hermanos, Sol y Jesús.

Por estar siempre orgullosos de mi y motivarme a seguir mis sueños.

A mis amigos.

A los de siempre, que me tienen y tengo como pensamiento.

A ustedes.

Por hacerme lo que soy.

Con el cariño de siempre,

Ing. Victoria Paola Cabrera Madera

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIAS.....	vii
ÍNDICE.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 Nanomateriales.....	1
1.2 Nanotubos de carbono.....	4
1.3 Efectos tóxicos de los nanomateriales.....	6
1.4 Estrés oxidativo.....	10
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1 Reactivos y nanomateriales.....	15
4.1.1 Soluciones y reactivos.....	15
4.1.2 Suspensión de nanotubos.....	18
4.2 Equipos.....	20
4.3 Preparación del tejido.....	20
4.4 Determinación de proteínas totales.....	20
4.5 Determinación de la oxidación de proteínas.....	21
4.6 Determinación de la peroxidación de lípidos.....	22
4.7 Determinación de la calidad del agua.....	23

4.8	Diseño experimental.....	26
4.9	Análisis estadístico	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1	Efecto del peróxido de hidrógeno.....	29
5.1.1	Peróxido de hidrógeno 100 μ M.....	29
5.1.2	Peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM.....	35
5.2	Efecto de los nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados (MWCNT-COOH)	42
5.3	Discusión general.....	48
	CONCLUSIONES	56
	RECOMENDACIONES.....	58
	REFERENCIAS	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Características de los nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados PELCO®.....	19
Tabla 2	Rangos óptimos fisicoquímicos para el mantenimiento de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>).....	25
Tabla 3	Biometría realizada a juveniles de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>) para el bioensayo con peróxido de hidrógeno 100 μ M.....	30
Tabla 4	Monitoreo de la calidad del agua durante el experimento con peróxido de hidrógeno 100 μ M, a las 0, 24 y 48 h.....	31
Tabla 5	Biometría realizada a juveniles de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>) para el bioensayo con peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM.....	36
Tabla 6	Monitoreo de la calidad del agua durante el experimento con peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM, a las 0, 24 y 48 h.....	39
Tabla 7	Biometría realizada a juveniles de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>) para el bioensayo con 20 ppm de nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados.....	43
Tabla 8	Monitoreo de la calidad del agua durante el experimento con 20 ppm de nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados, a las 0, 24 y 48 h.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Peroxidación lipídica causada por peróxido de hidrógeno 100 μ M en diferentes tejidos de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>)...	33
Figura 2	Oxidación de proteínas causada por peróxido de hidrógeno 100 μ M en diferentes tejidos de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>)...	34
Figura 3	Comparación entre las branquias de los tratamientos control 0 mM y 5 mM de peróxido de hidrógeno.....	37
Figura 4	Peroxidación lipídica causada por el peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM en diferentes tejidos de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>).....	40
Figura 5	Oxidación de proteínas causada por el peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM en diferentes tejidos de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>).....	41
Figura 6	Peroxidación lipídica causada por 20 ppm nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) en diferentes tejidos de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>).....	46
Figura 7	Oxidación de proteínas causada por 20 ppm de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) en diferentes tejidos de ostión japonés (<i>Crassostrea gigas</i>).....	47

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Actualmente se ha incrementando el empleo de materiales a escalas nanométricas en diversas ramas tecnológicas y biomédicas, por lo que también aumenta la potencial liberación al medio ambiente. Debido a las diferentes propiedades fisicoquímicas que presentan las nanopartículas en comparación a los materiales en escala macroscópica, pueden generar consecuencias biológicas adversas (Singh et al., 2009). Al finalizar el 2010 los diversos nanomateriales podían ser encontrarlos en aproximadamente 1000 productos disponibles en el mercado, cuya composición es de lo más variada (Peralta-Videa, 2011), por lo que la exposición humana parece ser algo cotidiano y de acuerdo a proyecciones estadísticas en un futuro próximo se incrementará exponencialmente (Singh et al., 2009; Shvedova et al., 2012).

1.1 Nanomateriales

Las nanopartículas manufacturadas comprenden una dimensión entre 1 y 100 nm y representan un estado supramolecular de la materia entre el estado molecular y el material en masa (Moore, 2006; Tedesco, 2010; Teow et al., 2011). Actualmente existen ya un sinnúmero de materiales nanoestructurados desarrollados a partir de la necesidad de mejorar la calidad de diversos productos; encontrando en las nanopartículas las propiedades ideales para lograrlo (Teow et al., 2011). Sin embargo, esta definición no es absoluta y

algunos estudios toxicológicos incluyen agregados de partículas que sobrepasan los 100 nm (Federici et al., 2007), aunque para fines prácticos se maneja esa longitud.

Estos nuevos materiales tiene propiedades físicas y químicas únicas, las cuales surgen del tamaño de partícula (una o más dimensiones del orden de 100 nm o menos), tienen gran área superficial (respecto al volumen), diferente conductividad y química de superficie que los mismos materiales en forma macrométrica (Moore, 2006; Federici et al., 2007).

Lo llamados nanotubos de carbono fueron descubiertos en 1991 por lijima, y son actualmente una de las nanopartículas más utilizadas. Consisten en una hoja de grafito enrollada en sí misma hasta formar un cilindro, con diámetros exteriores que varían de 0.4 a 5 nm (Baldrán et al., 2008). Se caracterizan por ser extremadamente fuertes, súper ligeras, con propiedades metálicas, que le brindan afinidad a la conductividad eléctrica y térmica (Sumio, 1991), lo que les permite su uso para la fabricación de fibras de transmisión para cables, en chips y en conectores para soldaduras. Los nanotubos son también excelentes candidatos para aplicaciones en la biología molecular y celular. Entre sus aplicaciones potenciales está su uso como biosensores, en el diagnóstico de enfermedades, transporte y liberación controlada de fármacos y vacunas. Debido a la presentación estructural de moléculas bioactivas en la superficie del nanotubo pueden funcionar como antígenos, así servir para la fabricación de implantes debido a su alta biocompatibilidad, mejorada gracias a la fabricación

de nanotubos orgánicos, como en el caso de 2 bases de ADN (Mendoza y Rodríguez-López, 2007).

Los nanocristales semiconductores, o mejor conocidos como puntos cuánticos (QDs por sus siglas en inglés “Quantum Dots”), son utilizados en luminiscencia, para hacer lámparas y demás aparatos luminiscentes, debido a que presentan ventajas significativas sobre las moléculas tradicionales fluorescentes como son los colorantes orgánicos y las proteínas fluorescentes. Además de que presentan diferentes colores de emisión, pueden ser excitados a la vez con una sola fuente de luz y con un mínimo solapamiento espectral. Poseen propiedades ópticas únicas que los hacen candidatos como nanosondas luminiscentes para aplicaciones biológicas, que van desde su uso en inmunoensayos con células vivas hasta obtención de imágenes del tejido (Arias et al., 2012).

Otras nanopartículas semiconductoras son fabricadas a partir de la combinación de un precursor metálico con elementos pertenecientes a la familia del óxidos. En general, como en el caso de los semiconductores comunes, las nanopartículas se forman de la mezcla de los elementos de la tabla periódica del grupo III con el grupo V, por ejemplo: fósforo y arsenuro de indio; o de la composición de los grupos IV y VI, como son el selenuro, telurio y sulfuro de plomo. Una propiedad interesante de estas nanopartículas es la fotoluminiscencia, capaz de absorber fotones para después emitirlos en una longitud de onda en el rango visible (Quintana et al., 2010).

Las nanoestructuras metálicas, que pueden ser de oro, plata, platino, cobre, paladio, etc., tienen como principal característica contener un número determinado de electrones libres confinados en un espacio muy pequeño. Lo anterior les da propiedades como la resonancia plasmónica, que es la propiedad de interactuar específicamente con la luz, como en el caso del oro, donde soluciones de distintos tamaños de nanopartículas presentan colores que van desde el púrpura hasta el marrón. Este cambio de color es resultado de la oscilación colectiva de los electrones al interactuar con la luz. Otro ejemplo es el cobre, un metal blando con una buena maleabilidad; propiedad que se pierde en las nanopartículas de tamaño menor a 50 nm, las cuales presentan dureza extrema (Quintana et al., 2010; Fairbairn et al., 2011).

Son importantes también por sus propiedades de conducción de calor y electricidad, algunas como las de plata son conocidas por sus propiedades biocidas, es decir, que eliminan a los microorganismos, lo que fomenta la conservación de alimentos como frutas y verduras (Wong et al., 2007; Fabrega et al., 2011), así como las de platino y titanio, utilizadas en el diagnóstico de enfermedades o en diferentes catalizadores (Fairbairn et al., 2011).

1.2 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son uno de los nanomateriales emblemáticos por excelencia, ya que durante los últimos 20 años, desde que fueron descubiertos y sus propiedades descritas (Iijima, 1991), han generado investigación y

desarrollo en múltiples áreas alrededor del mundo (Boczkowski y Lanone, 2012).

Son estructuras con base en carbono que consisten en hojas de grafito enrolladas, las cuales se organizan en cilindros de una sola capa o de múltiples capas concéntricas (hasta 20). Los cilindros construidos con una sola capa de grafito son conocidos como nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT, single walled carbon nanotubes) con diámetros de 0.4-2 nm, mientras que los que tienen múltiples capas son conocidos como nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT, multiwalled carbon nanotubes) con diámetros que varían entre los 1.4 y 100 nm (Lin et al., 2004; Mallick y Strydom, 2013). Poseen una elevada fuerza de tensión, son ultra ligeros y tienen excelente estabilidad química. Estas propiedades físico-químicas en combinación con sus propiedades mecánicas y electrónicas, así como su estabilidad térmica, conforman una plétora de aplicaciones que apenas se alcanza a vislumbrar (Smart et al., 2006; Boczkowski y Lanone, 2012; Mallick y Strydom, 2013).

Generalmente se sintetizan por el método de arco de descarga eléctrica o voltaica (Iijima, 1991), por ablación láser, depósito por vapor químico, con el método sonoquímico o hidrotérmico, o bien por hidrólisis. Actualmente existen métodos novedosos utilizando técnicas litográficas para la deposición del catalizador que construye la nanocapa de grafito, o bien utilizando óxido de aluminio anodizado nanoporoso como patrón para el crecimiento de los nanotubos. Sin embargo los métodos más utilizados en los últimos años siguen

siendo la depositación química de vapor y su variante intensificada por plasma (Hirlekar et al., 2009; Prasek et al., 2011).

Actualmente los nanotubos de carbón son de los nanomateriales más utilizados tanto en las diferentes industrias como en la medicina y de los que más ingresos genera en esta reciente industria nanotecnológica, con una demanda (reportada en 2009) de 90 millones de dólares para los SWCNT y de 120 millones de dólares para los MWCNT. Además, se proyecta que para el 2014 esta demanda sea de 600 y 470 millones de dólares, respectivamente (Smart et al., 2006; Shvedova et al., 2012). Sus aplicaciones comerciales van desde la industria aeroespacial, pasando por la industria informática y electrónica, su empleo en artículos deportivos, la industria textil y la cosmética, hasta llegar a sus aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas (Lin et al., 2004; Smart et al., 2006; Klaper et al., 2010; Boczkowski y Lanone, 2012; Mallick y Strydom, 2013). Dado este creciente empleo, la demostrada toxicidad de algunos nanomateriales y el aumento en el contacto directo al público, se incrementa el potencial nocivo de su exposición (Shvedova et al., 2012) lo cual plantea dudas acerca de los efectos que pudiera tener la liberación de nanocompuestos al medio ambiente y la biomagnificación de los mismos en los diferentes ecosistemas (Klaper et al., 2010).

1.3 Efectos tóxicos de los nanomateriales

Es un hecho que el tamaño, la interfase nanocompuesto-biomolécula, la movilidad, la persistencia en el medio y la biodegradabilidad de la partícula son

factores directamente relacionados con su toxicidad y las patologías desarrolladas por el organismo (Moore, 2006; Fairbairn et al., 2011;).

En el caso de las macromoléculas policatiónicas, éstas muestran una fuerte interacción *in vitro* con las membranas celulares, mientras que la interacción de las nanopartículas con el área superficial de los tejidos biológicos está determinado por la química de superficie y reactividad (Moore, 2006).

Estas características, sobre todo el área superficial, están relacionadas en la generación directa de especies reactivas de oxígeno, las cuales causan lesiones por alteraciones en la señalización celular, daño directo al ADN, oxidación de proteínas, peroxidación lipídica y daño en membranas (Moore, 2006; Tedesco et al., 2010; Lapresta-Fernández et al., 2012). Estos efectos pueden ser utilizados como biomarcadores, ya que son mucho más sensibles que los ensayos toxicológicos tradicionales, y proveen información sobre el impacto sub-letal de los estresantes (Canesi et al., 2012).

La dosis tóxica es difícil de estimar ya que no está relacionada con la masa como ocurre en toxicología clásica. Además de que el número de partículas que ingresan a la célula es difícil de estimar. Por lo que la toxicidad se relaciona a las características de la nanopartícula, sobre todo en la superficie total de la misma, que es donde ocurren la mayoría de las reacciones químicas de interés. El número de nanopartículas entre determinados tamaños y un rango de

formas, proporciona una estimación del área superficial y por lo tanto es probable cuantificar una dosis que tenga efectos (Elsaesser y Howard, 2012).

Las nanopartículas de plata (AgNP) y de dióxido de titanio (TiO₂) son las mejor estudiadas tanto en mamíferos como en organismos acuáticos, además de que están contenidas en un amplio espectro de productos de uso común. Es posible encontrarlas en textiles, la industria alimenticia, pantallas de televisores, cosméticos, bloqueadores solares, biosensores, electrónicos, y en la industria médica, entre otros (Federici, et al., 2007; Ahamed et al., 2010; Fairbairn et al., 2011). La exposición a AgNP ha sido estudiada *in vivo* e *in vitro*, ésta última tanto en mamíferos como no mamíferos. En las pruebas *in vitro* realizada en células de mamíferos (células Jurkat y HeLa) se encontraron efectos dañinos en piel, pulmón, hígado, cerebro, sistema vascular y órganos reproductivos (Miura y Shinohara, 2009; Sriwichai et al., 2010). Mientras que en las pruebas *in vivo* con mamíferos (ratas), se encontró una biodistribución sistemática e impacto en diferentes órganos como pulmón, hígado y cerebro (Hussain et al., 2005; Kim et al., 2009). Por otra parte las pruebas *in vivo* en organismos modelo, como *Drosophila*, pez cebra y otros peces, han mostrado que inducen al desarrollo de malformaciones estructurales en los organismos (Bilberg et al., 2010; Powers et al., 2010).

Existen otros nanomateriales cuyos efectos tóxicos han sido poco estudiados, pero su uso es extensivo. Como el germanato de bismuto (GBO), óxido de itrio dopado con europio (Y₂O₃:Eu³⁺) y la hidroxiapatita (HA). El GBO es empleado

como detector en investigación científica, industria y medicina (Oviedo et al., 2012a); mientras que las nanopartículas de óxido de itrio, de acuerdo a estudios realizados en roedores por Schubert et al. (2006), podría ser utilizado como antioxidante.

Por otro lado, la HA sintetizada es un tipo de fosfato cálcico que es ampliamente utilizado en ortodoncia y traumatología por su alta biocompatibilidad con los tejidos óseos, así como la gran similitud con la HA natural presente en huesos y dentaduras (Hu et al., 2007). Estudios recientes sugieren que controlando las propiedades fisicoquímicas de la HA es posible utilizarla en aplicaciones no médicas, como fase estacionaria en cromatografía, sensores gaseosos y catálisis (Oviedo et al., 2012b). Sin embargo, no se han realizado suficientes estudios toxicológicos y la poca bibliografía existente se encuentra centrada en mamíferos, como conejos. Los datos muestran que no existe toxicidad para los organismos (Hu et al., 2007; Tran y Webster, 2009; Montazeri et al., 2011), por lo que se le considera dentro de los nanomateriales seguros de utilizar.

En resumen, diversos estudios han demostrado que las nanopartículas inducen citotoxicidad, estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en el organismo (Singh et al., 2009). La importancia de evaluar la toxicidad en el medio acuoso se debe a que la mayor parte de los desechos industriales y urbanos van a parar al ambiente, sobre todo a los cuerpos acuáticos (Klaine et al., 2008; Bhatt y Nath, 2011). Además, se ha demostrado que la mayoría de los nanomateriales tienen

un efecto tóxico superior en organismos acuáticos, donde factores fisicoquímicos del agua como el pH, fuerza iónica y salinidad favorece la disolución, absorción y bioacumulación de los compuestos xenobióticos, permitiendo que éstos estén biodisponibles para los organismos (Moore, 2006; Klaine et al., 2008; Klaper et al., 2010).

La evaluación de la toxicidad en el medio acuático organismos acuáticos no es reciente, por años se ha utilizado al ostión japonés (*Crassostrea gigas*) como indicador de contaminantes en este medio. Además considerando que los invertebrados representan el 95% de las especies animales y que estos tienen un rol ecológico importante, que representa la transferencia potencial de nanopartículas a través de la cadena alimenticia (Canesi et al., 2012)., resulta interesante utilizarlo como bioindicador. Por otro lado, las rutas potenciales de ingreso de nanopartículas a su sistema incluyen la ingestión directa o a través de tejido epitelial como branquias, así como por la pared celular de diferentes órganos, lo cual lo convierte en un organismo fácilmente manipulable, accesible y atractivo para este tipo de estudios (Moore, 2006), además menos del 10% de los estudios realizados sobre toxicidad utilizando biomarcadores, han sido realizados en invertebrados marinos (Cattaneo et al., 2009), lo cual permite explorar un área poco explotada.

1.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una característica patológica del envejecimiento y un mecanismo de respuesta a la toxicidad de contaminantes ambientales (Tedesco

et al., 2010). Esto ocurre cuando se genera un desequilibrio entre la producción de radicales libres, como las especies reactivas del oxígeno (EROs) o agentes prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante de un organismo (Ochoa y González, 2008). Estas defensas incluyen enzimas como la catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa y tioles como el glutatión (Tedesco et al., 2010).

La cuantificación de los mecanismos antioxidantes y de los daños provocados por la condición de estrés oxidativo en sistemas biológicos es utilizada para evaluar efectos tóxicos inducidos por diferentes clases de contaminantes (Ochoa y González, 2008). Uno de los métodos más utilizados es la cuantificación de hidroperóxidos orgánicos como indicador del daño inicial al organismo producido por los radicales y otras EROs (Gay y Gebicki, 2003). De hecho, el peróxido de hidrógeno, al ser un potente oxidante involucrado en la oxidación de moléculas orgánicas a radicales peroxilos e hidroperóxidos, es utilizado como control positivo en una amplia variedad de condiciones patológicas relacionadas con el daño oxidativo (Nourooz-Zadeh, 1994; Gay y Gebicki, 2003; Oberdörster, 2004).

Por otro lado, los compuestos xenobióticos, como los nanomateriales, contribuyen al estrés oxidativo en varios niveles biológicamente relevantes (Tedesco et al., 2010) y los mecanismos de acción pueden ser químicos o físicos. Los químicos incluyen la producción de especies reactivas del oxígeno, disolución y liberación de iones tóxicos, alteración del transporte electrónico en

las membranas celulares, daño oxidativo a través de catálisis, peroxidación lipídica o propiedades surfactantes. Las EROs son consideradas como el principal proceso químico subyacente en nanotoxicología, liderando procesos secundarios que finalmente pueden ocasionar daño significativo e incluso muerte celular (Elsaesser y Howard, 2012).

HIPÓTESIS

La presencia de nanotubos de carbono en el agua filtrada por las branquias del ostión japonés (*Crassostrea gigas*) inducirá la oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos en los diferentes tejidos del organismo.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar los efectos de la presencia de nanotubos de carbono en concentraciones de partes por millón en ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

3.2 Objetivos específicos

- Estudiar la oxidación de proteínas en branquias, gónadas, glándula digestiva, manto y músculo retráctil del ostión japonés expuesto a nanotubos de carbono.
- Estudiar la peroxidación de lípidos en branquias, gónadas, glándula digestiva, manto y músculo retráctil del ostión japonés expuesto a nanotubos de carbono.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y nanomateriales

A continuación se describen, en sus apartados correspondientes, las soluciones y reactivos que se prepararon para realizar los diferentes análisis, así como las características de los nanomateriales utilizados.

4.1.1 Soluciones y reactivos

a) Buffer HEPES 50 mM/Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.1 mM

Se preparó una solución stock de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 3 mM en 10 mL de isopropanol, se colocó en un frasco ámbar, adicionalmente se recubrió con aluminio para evitar el contacto con la luz y se almacenó a -20°C.

Para los análisis de cada bioensayo se prepararon 20 mL de buffer 50 mM HEPES (0.239 g de sal HEPES diluida en un litro de agua destilada). A esta solución se le adicionaron 0.66 mL de PMSF 3 mM y se aforó a 20 mL con agua destilada. De esta manera la concentración final de PMSF fue de 0.1 mM. Finalmente, se ajustó el pH a 7.2.

Esta solución se preparó unas horas antes de realizar los análisis y se refrigeró en un frasco cubierto con aluminio para evitar el contacto con la luz. Durante su empleo se mantuvo en hielo.

b) Solución FOX

El reactivo de ensayo para la determinación de peróxidos lipídicos utilizado fue una solución ferrosa del naranja de xilenol (FOX), la cual se preparó disolviendo el naranja de xilenol (XO) 2.5 mM y sulfato de amonio ferroso (SFA) 2.5 mM en 110 mM ácido perclórico (HClO_4). Un volumen de este reactivo concentrado es agregado a 9 volúmenes de metanol grado HPLC. El reactivo FOX es calibrado contra soluciones de H_2O_2 de concentración conocida. Para los análisis de cada bioensayo se prepararon 50 mL de reactivo FOX, utilizando 0.095 g de XO 0.0490 g de SFA y 0.475 mL de HClO_4 . Se aforó a 50 mL con una mezcla de nueve partes de metanol grado HPLC (45 mL) y 1 parte de agua destilada (5 mL). De esta manera las concentraciones finales corresponden a 2.5 mM de XO, 2.5 mM de SFA y 110 mM de HClO_4 .

c) Solución de estreptomicina al 20%

Se preparó una solución stock de 5 mL de estreptomicina al 20%. Se pesó 1 g de sulfato de estreptomicina y se aforó a 5 mL con agua destilada. Esta solución se refrigeró durante su almacenamiento.

d) Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM

Se preparó siguiendo el protocolo descrito por Ruekberg y Rossoni (2005). De acuerdo a este método se considera la concentración requerida de 2-4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) y a parte la solución líquida compuesta por etanol, agua y ácido sulfúrico (H_2SO_4). De la cual el 67% de la solución corresponde a

etanol, 19% al agua y el restante 14% al ácido sulfúrico. Previamente se preparó un stock de 100 mL de ácido sulfúrico 2 M. Se tomaron 10.3 mL de H_2SO_4 concentrado y se aforó a 100 mL con agua destilada. Para los análisis de cada bioensayo se prepararon 20 mL de solución de DNPH 10 mM, para la cual se utilizaron 0.039 g de DNPH, 13.4 mL de etanol al 96%, 3.8 mL de agua destilada y 2.8 mL de ácido sulfúrico 2 M.

El procedimiento fue el siguiente: Se agregó la DNPH, el etanol y el agua en un matraz colocado en baño de hielo y con agitación constante. Posteriormente se adicionó lentamente, por las paredes, el ácido sulfúrico. Se dejó en agitación hasta que se enfrió la solución y que el DNPH estuviera completamente disuelto. Se filtró en caso necesario. La solución debe quedar homogénea para que no cause interferencias en el análisis y se almacenó en un frasco ámbar.

e) Solución de ácido tricloroacético al 20%

Se preparó una solución stock de 100 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se pesaron 20 g de TCA y se aforaron a 100 mL con agua destilada. Esta solución se mantuvo en refrigeración durante su almacenamiento.

f) Mezcla etanol-etil acetato 50:50

Se preparó un stock de 500 mL de la mezcla. Se utilizaron 250 mL de etanol al 96% y 250 mL de etil acetato. Esta solución se mantuvo en refrigeración durante su almacenamiento.

g) Solución de guanidina 6 M/ditiotreitól 10 mM

Esta solución se preparó unas horas antes de ser utilizada. Primero a un volumen de agua destilada menor al que se necesita, se le adiciona únicamente la guanidina, se agitó y se mantuvo en refrigeración. Aproximadamente una hora antes de emplearla se le adicionó el ditiotreitól (DTT), se agitó e incubó a 37°C. Para los análisis de cada bioensayo se prepararon 25 mL de ésta solución. Se utilizaron 14.32 g de cloruro de guanidina y 0.25 mL de solución DTT 1 M (reactivo original). De esta manera la solución tuvo una concentración final de guanidina de 6 M y de DTT 10 mM.

4.1.2 Suspensión de nanotubos.

Las nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados (COOH-Multi-walled PELCO® Carbon Nanotubes; MWCNT-COOH) se adquirieron en TED PELLA, INC. Los cuales son manufacturados utilizando el método de deposición química de vapor y caracterizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Tienen un diámetro Ø4-12nm (TEM) y una longitud media entre 5 y 15 nm, además de las características mostradas en la tabla 1. Con el objetivo de lograr que la concentración final de cada pecera del tratamiento sea de 20 ppm de nanotubos, se consideró el volumen de la pecera (12.5 L). Las suspensiones se prepararon colocando los 250 mg de nanotubos en viales con 5 mL con agua de mar. Se sumergieron en un baño sónico durante 15 minutos previos a su dosificación en las peceras.

Tabla 1. Características de los nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados PELCO®

Pureza:	
Nanotubos de carbono	>90% volumen
Nanotubos de pared simple	N/A
Nanotubos de pared múltiple	<70% volumen
Contenido de carbono amorfo	<5% peso

4.2 Equipos

- Balanza analítica Sartorius BP 221 S
- Balanza OHAUS Valor™ 2000
- Homogenizador de tejidos Tissue Tearor™
- Sonicador ULTRASONIK Ney 19H
- Incubadora PRECISION Dubnoff Metabolic Shakin Incubator
- Centrifuga Beckman Coulter Allegra™ 25R - Rotor TA-15-1.5
- Espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ 2

4.3 Preparación del tejido

Los tejidos se prepararon siguiendo el método de Anderson. Después de la disección, los tejidos se homogenizaron en 4 volúmenes de buffer HEPES 50 mM, pH 7.2, más 0.1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo utilizando un homogenizador de tejidos eléctrico y manteniendo los tejidos en hielo. El homogenizado se centrifugó a 14,000 x g durante 5 minutos a 4°C.

4.4 Determinación de proteínas totales

Las proteínas totales se determinaron utilizando el kit comercial de Bio-Rad® que se basa en el método Bradford. Inicialmente se realizó una curva de calibración siguiendo el procedimiento descrito en el kit, utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar. Con estos datos se obtuvo una ecuación de recta ($y = mx + b$), la cual se utilizó para calcular la concentración de proteína de la muestra relativa a la concentración de BSA.

El kit para la determinación de proteína Bio-Rad® (Bio-Rad protein assay kit), trae un reactivo que se basa en la técnica de Bradford. Este se basa en la unión del colorante azul Coomassie con la proteína y es leído en un espectrofotómetro a 595 nm. Es un método relativamente sensible, cuyo reactivo debe ser previamente calibrado contra concentraciones conocidas de una proteína estándar, en este caso seroalbúmina bovina (BSA). Su sensibilidad va de 1-15 µg/mL. Antes de ser utilizado, el reactivo colorante se filtra, se coloca en un frasco limpio y se refrigera para su almacenamiento, hasta su empleo, tal como sugiere el protocolo de la compañía.

Para el análisis de los tejidos se tomaron 10 µL de tejido homogenizado en buffer Hepes, a los cuales se les agregaron 790 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo BioRad. La mezcla se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se llevara a cabo la reacción. Finalmente, las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 595 nm en celdas de cuarzo.

4.5 Determinación de la oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas se determinó como el contenido de grupos carbonilos en la fracción proteica. Este se cuantificó en branquias, gónadas, glándula digestiva, manto y músculo retráctil, mediante el reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), normalizado a proteínas totales.

Para la cuantificación de la oxidación de proteínas se consideró la metodología de Oberdörster (2004), la cual es como sigue: Se tomaron 100 µL del tejido

homogenado y se le adicionaron 10 μL de estreptomicina al 20% para remover los ácidos nucleicos. Después de incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, el DNA es removido por centrifugación a 14,000 x g por 5 minutos. Se adicionaron 4 volúmenes de DNPH 10 mM en ácido clorhídrico (HCl) 2 mM, aforando hasta 100 μL de sobrenadante libre de DNA. Éste se incubó una hora a temperatura ambiente agitando ligeramente cada 10-15 min. Las proteínas son precipitadas por la adición de 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Se centrifugó a 14,000 x g por 5 min. El *pellet* obtenido es lavado tres veces con una solución 50:50 de etanol:etilacetato para remover la DNPH que no haya reaccionado. El *pellet* es redisolto a 37°C en 450 μL de una mezcla de guanidina HCl/diotiotreitol (DTT). Se hacen alícuotas de 200 μL para ser leídas por duplicado en un espectrofotómetro, con una absorbancia máxima de 360 nm en celdas de cuarzo. El contenido de grupos carbonilos se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del mismo, $\epsilon_{400} = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4.6 Determinación de la peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se cuantificó en branquias, gónadas, glándula digestiva, manto y músculo retráctil, mediante la oxidación ferrosa del naranja de xilenol (o-cresolsulfonftaleína-3,3'-bis(ácido metiliminodiacético) sal sódica), siguiendo la metodología de Nourooz-Zadeh et al. (1993).

Las muestras (100 μL) que contienen los hidroperóxidos son mezcladas con 900 μL de reactivo FOX y son incubadas a temperatura ambiente por 30 min en tubos de ensayo. La absorbancia del sobrenadante es leída a 560 nm en celdas

de cuarzo. Previo a los análisis, se realizó una curva de calibración de la solución FOX con peróxido de hidrógeno de 0 a 15 μM , la cual se leyó en un espectrofotómetro a 560 nm. El contenido de hidroperóxidos se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno, $\epsilon=4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 560 nm. Con estos datos se obtuvo como resultado una ecuación de recta ($y = mx + b$), la cual se utilizó para calcular la concentración nanomolar de lipoperóxidos producidos en las muestras analizadas.

4.7 Determinación de la calidad del agua

La calidad del agua se determinó cuantificando parámetros fisicoquímicos, tales como: pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza, salinidad, amonio, nitritos y fosfatos.

La temperatura y el oxígeno disuelto, se midieron utilizando un oxímetro portátil (YSI Modelo Y55), cuyos rango son de -5°C a 45°C y 0 a 20 mg/L, respectivamente; para la determinación de la salinidad se utilizó un refractómetro de salinidad portátil (VITAL SINE SR-6), cuyo rango es de 0 a 20 ppm; mientras que el pH, la dureza, el amonio, los nitritos y fosfatos, se cuantificaron mediante *kit* colorimétricos específicos para cada uno de ellos (Aquarium Pharmaceuticals de Mars Fishcare, Estados Unidos).

Estos parámetros se contrastaron con los parámetros fisicoquímicos óptimos o adecuados para el mantenimiento del ostión japonés, y se utilizaron

indirectamente para monitorear la respuesta de los organismos a las condiciones experimentales (tabla 2).

Tabla 2. Rangos óptimos fisicoquímicos para el mantenimiento de ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

Parámetro	Rango óptimo
pH	7.8 – 8
Temperatura, °C	16 – 24
Oxígeno disuelto, mg/mL	3 – 9.5
Dureza, ppm	140
Salinidad, ppm	15 – 34
Amonio, mg/L	0
Nitritos, mg/L	0
Fosfatos, mg/mL	0

(FAO, 2006; Góngora-Gómez et al., 2012).

4.8 Diseño experimental

Para la realización del estudio propuesto, el organismo modelo con el que se trabajó es el ostión japonés (*Crassostrea gigas*) que ha sido utilizado como indicador de contaminantes en el medio acuático.

Los ostiones (*Crassostrea gigas*) (115 organismos) fueron amablemente donados por la empresa Acuicultura Integral S.A. de C.V. de Ensenada, Baja California. Se mantuvieron en condiciones controladas para mantenimiento. Los organismos utilizados en los bioensayos con peróxido de hidrógeno se mantuvieron durante dos semanas en condiciones controladas, siendo alimentados con una ración al 3% de *Isochrysis galbana*; mientras que los organismos utilizados en el bioensayo con nanotubos de carbono se mantuvieron en condiciones controladas durante menos 2 días y se alimentaron con una ración al 3% de alimento comercial Shellfish Diet® (30% *Isochrysis*, 20% *Pavlova*, 20% *Tetraselmis* y 30% *Thalassiosira weissflugii*), monitoreando el cambio de color en el agua, como indicador de consumo de alimento.

Los bioensayos se realizaron de manera independiente con una distribución al azar, utilizando como unidad experimental peceras de cristal, en donde cada una contenía 5 organismos en 12.5 L de agua de mar. Durante los experimentos, el pH, temperatura, oxígeno disuelto y salinidad se mantuvieron dentro de las condiciones óptimas para estos organismos (Tabla 2).

A continuación se describe de manera individual el diseño experimental de cada uno de los bioensayos:

a) Bioensayo con peróxido de hidrógeno 100 μ M

Para el análisis del efecto del peróxido de hidrógeno 0 y 100 μ M sin y con alimentación, se probaron cuatro tratamientos (n=4) por duplicado durante 48 horas, con re-dosificación de peróxido (100 μ M) a las 24 horas.

Se utilizaron, por cada tratamiento, 5 juveniles de ostión (7.39 \pm 0.4 cm) en peceras de cristal con 12.5 L de agua de mar, con temperatura promedio de 21.5 \pm 0.43 $^{\circ}$ C y un pH de 7.8 \pm 0.05.

Los organismos se alimentaron con una ración diaria de 3% de de *Isochrysis galbana*, monitoreando el cambio de color en el agua, como indicador de consumo de alimento.

b) Bioensayo con peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM

Para el análisis del efecto del peróxido de hidrógeno 0, 1 y 5 mM se probaron tres tratamientos (n=3) por triplicado durante 48 horas, todos con alimentación y una re-dosificación de peróxido a las 24 horas (1 y 5 mM). Se utilizaron, por cada tratamiento, 5 juveniles de ostión (7.22 \pm 0.5 cm) en peceras de cristal con 12.5 L de agua de mar, con temperatura promedio de 19.3 \pm 0.25 $^{\circ}$ C, un pH de 7.9 \pm 0.08 y oxígeno disuelto de 7.9 \pm 0.09 mg/mL.

Los organismos se alimentaron con una ración diaria de 3% de *Isochrysis galbana*, monitoreando el cambio de color en el agua como indicador de consumo de alimento.

c) Bioensayo con 20 ppm de nanotubos de carbono carboxilados (MWCNT-COOH)

Para el análisis del efecto de una suspensión de nanotubos de 0 y 20 ppm, se probaron dos tratamientos (n=2) por triplicado durante 48 horas, todos con alimentación. Se utilizaron, por cada tratamiento, 5 juveniles de ostión (6.44 ± 0.49 cm) en peceras de cristal con 12.5 L de agua de mar, con temperatura promedio de 17.5 ± 0.36 °C, un pH de 7.8 ± 0.10 y oxígeno disuelto de 7.6 ± 0.15 mg/mL.

Los organismos se alimentaron con una ración al 3% de alimento comercial Shellfish Diet® (30% *Isochrysis*, 20% *Pavlova*, 20% *Tetraselmis* y 30% *Thalassiosira weissflugii*), monitoreando el cambio de color en el agua como indicador de consumo del alimento.

4.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico Sigma Stat® Versión 3.5. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95% de confianza y una prueba de Tukey para explorar diferencias entre datos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Efecto del peróxido de hidrógeno

5.1.1 Peróxido de hidrógeno 100 µM

a) Biometrías

Se utilizaron 40 juveniles de ostión japonés de 7.39 ± 0.4 cm. Cada uno de los organismos utilizados se midió y pesó al inicio y final del experimento como se observa en la Tabla 3. Esto se realizó con el objetivo de que la distribución de tamaños y pesos fuera uniforme en todos los tratamientos.

La sobrevivencia fue del 100%, aunque algunos organismos (en cada uno de los tratamientos) tenían una alta carga de parásitos (poliquetos y anélidos) y otros restos en su interior.

b) Calidad del agua

Con el objetivo de diagnosticar a tiempo si los organismos estaban siendo sometidos a un estrés diferente al del experimento, se monitoreó la calidad del agua, mediante los siguientes parámetros: pH, temperatura, dureza, salinidad, amonio, nitritos y fosfatos. En la Tabla 4 se observan los valores obtenidos para cada uno de dichos parámetros.

Tabla 3. Biometría realizada a juveniles de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) para el bioensayo con peróxido de hidrógeno 100 µM.

Tratamiento	# Organismo	Longitud (cm)	Peso total (g)	Peso concha f (g)	Peso blando i (g)	Peso blando f (g)
CP/A-2	1	7.71	54	33	21	8
CP/A-2	2	7.82	40.5	25.5	15	4
CP/A-2	3	7.18	40.5	24	16.5	4
CP/A-2	4	6.98	39.5	23.5	16	6
CP/A-2	5	8.24	43.5	27.5	16	5.5
SP-2	6	7.82	48.5	30.5	18	6
SP-2	7	7.23	45	30	15	6
SP-2	8	7.44	52	34	18	7.5
SP-2	9	7.07	40.5	26	14.5	4.5
SP-2	10	6.82	39.5	24	15.5	4
SP/A-2	11	7.5	62.5	36	26.5	6.5
SP/A-2	12	7.41	72	48	24	8.5
SP/A-2	13	7.04	42	26.5	15.5	5
SP/A-2	14	7.25	42.5	37	5.5	7.5
SP/A-2	15	7.47	68.5	28	40.5	6
CP/A-1	16	6.26	56	40	16	6
CP/A-1	17	7.81	37	22.5	14.5	4
CP/A-1	18	7.36	40	26	14	4
CP/A-1	19	7.29	44.5	28	16.5	4
CP/A-1	20	7.41	44	27	17	6
CP-2	21	6.97	35.5	21	14.5	6
CP-2	22	7.34	41.5	25	16.5	6
CP-2	23	7.05	45.5	29	16.5	5
CP-2	24	7.49	48	28.5	19.5	5.5
CP-2	25	6.98	38	25	13	3
SP/A-1	26	7.23	45	32	13	5
SP/A-1	27	7.94	41.5	28	13.5	4
SP/A-1	28	7.6	38.5	24.5	14	5
SP/A-1	29	7.08	36	28	8	5.5
SP/A-1	30	7.96	59	38.5	20.5	7
CP-1	31	7.27	39.5	24.5	15	3
CP-1	32	7.19	46	30	16	6
CP-1	33	7.57	48.5	31	17.5	6.5
CP-1	34	8.02	42	26.5	15.5	4
CP-1	35	7.73	43	30	13	6
SP-1	36	7.189	44	24	20	5.5
SP-1	37	7.54	53	23.5	29.5	7
SP-1	38	8.11	42.5	26.5	16	4.5
SP-1	39	7.66	52.5	36.5	16	6.5
SP-1	40	6.73	41	28	13	3.5
PROMEDIOS		7.39	45.83	28.93	16.90	5.44
DS		0.406	8.389	5.490	5.650	1.345

Notación: SP → Sin peróxido y sin alimentación; CP → Con peróxido y sin alimentación; SP/A → Sin peróxido y con alimentación; CP/A → Con peróxido y sin alimentación; DS → Desviación estándar. Los números después del guión en las abreviaturas indican qué número del triplicado es.

Tabla 4. Monitoreo de la calidad del agua durante el experimento con peróxido de hidrógeno 100 µM, a las 0, 24 y 48 h.

	Parámetros						
	pH	T, °C	Dureza, ppm	Salinidad, ppm	Amonia, mg/L	Nitritos, mg/L	Fosfatos, mg/L
Estanques	7.4	24.2	71.6	34	2	0	2
Inicial	7.8	24.4	143.2	33	0	0	0
Tratamientos							
	0 h						
CP/A-2	7.8	21.5	143.2	32	0.25	0	0
SP-2	7.8	19.7	107.4	34	0.25	0	0
SP/A-2	7.8	21.2	143.2	34	0.25	0	0
CP/A-1	7.8	20.1	143.2	33	0.25	0	0
CP-2	7.8	21.7	143.2	34	0.25	0	0
SP/A-1	7.8	21.1	107.4	34	0.25	0	0
CP-1	7.8	21.3	107.4	34	0.25	0	0
SP-1	7.8	21.4	107.4	34	0.25	0	0
Promedio	7.80	21.00	125.30	33.63	0.25	0	0
	24 h						
CP/A-2	7.8	21.8	107.4	33	1	0	0.25
SP-2	7.8	20.8	107.4	32	0.5	0	0
SP/A-2	7.8	22	125.3	32	1	0.25	0.25
CP/A-1	7.8	21.3	107.4	34	0.5	0	0.25
CP-2	7.8	22.1	125.3	34	0.25	0	0
SP/A-1	7.8	21.9	107.4	34	1	0.25	0.25
CP-1	7.4	21.9	107.4	33	2	0	0.25
SP-1	7.8	21.9	107.4	32	0.25	0	0
Promedio	7.75	21.7	111.9	33.00	0.81	0.06	0.16
	48 h						
CP/A-2	8	21.9	107.4	31	1	0.25	0.5
SP-2	7.8	20.9	107.4	34	1	0.25	0.25
SP/A-2	8	21.9	107.4	32	2	1	0.5
CP/A-1	7.8	21.3	107.4	34	2	0.25	0.5
CP-2	8	22.3	125.3	33	0.5	0.25	0.25
SP/A-1	8	21.9	107.4	32	1	1	0.25
CP-1	7.4	22.1	107.4	34	4	0.25	1
SP-1	7.8	22	107.4	34	1	0.25	0.25
Promedio	7.85	21.79	109.64	33.00	1.56	0.44	0.44
Prom. Gral.	7.8	21.5	115.6	33.2	0.9	0.2	0.2
DS	0.050	0.435	8.471	0.361	0.658	0.237	0.222

Notación: SP → Sin peróxido y sin alimentación; CP → Con peróxido y sin alimentación; SP/A → Sin peróxido y con alimentación; CP/A → Con peróxido y sin alimentación; DS → Desviación estándar. Los números después del guión en las abreviaturas indican qué número del triplicado es.

c) Peroxidación de lípidos

La presencia de 100 μM de peróxido de hidrógeno, aparentemente tiene el mismo efecto en el contenido de lipoperóxidos en los diferentes tejidos del ostión japonés (*C. gigas*) en un mismo tratamiento ni entre tratamientos. No es posible evaluar si existen diferencias significativas, pero se observa una tendencia en el efecto, comparado con el efecto que tienen 1 y 5 mM de peróxido de hidrógeno.

d) Oxidación de proteínas

La presencia de 100 μM de peróxido de hidrógeno tienen un efecto similar en la oxidación de proteínas en los diferentes tejidos del ostión japonés (*C. gigas*) en un mismo tratamiento ni entre tratamientos.

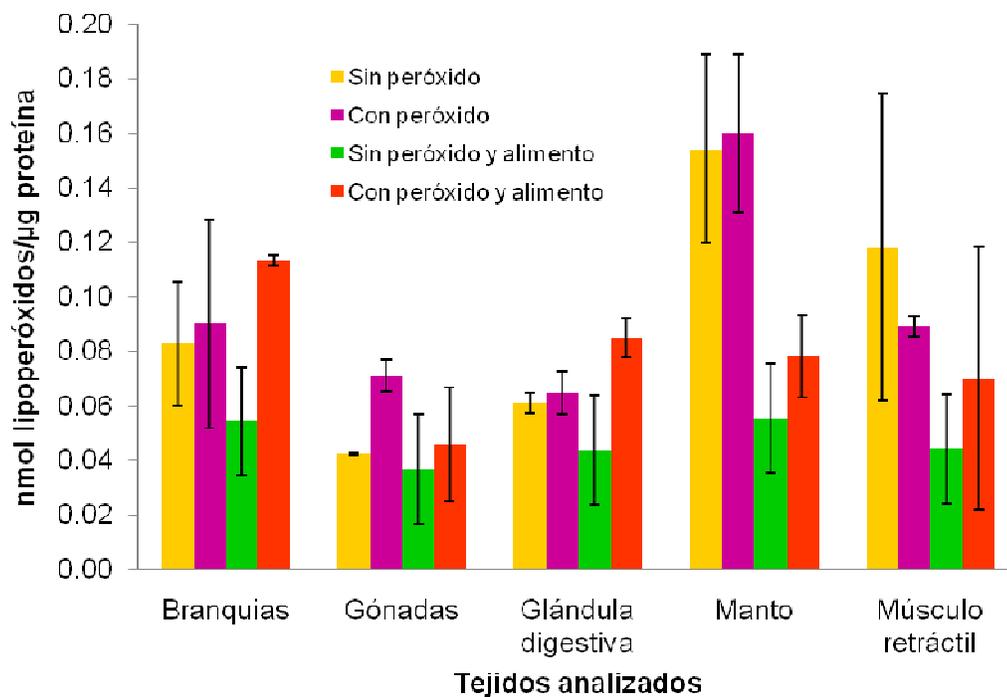


Figura 1. Peroxidación lipídica causada por peróxido de hidrógeno 100 μ M en diferentes tejidos de ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

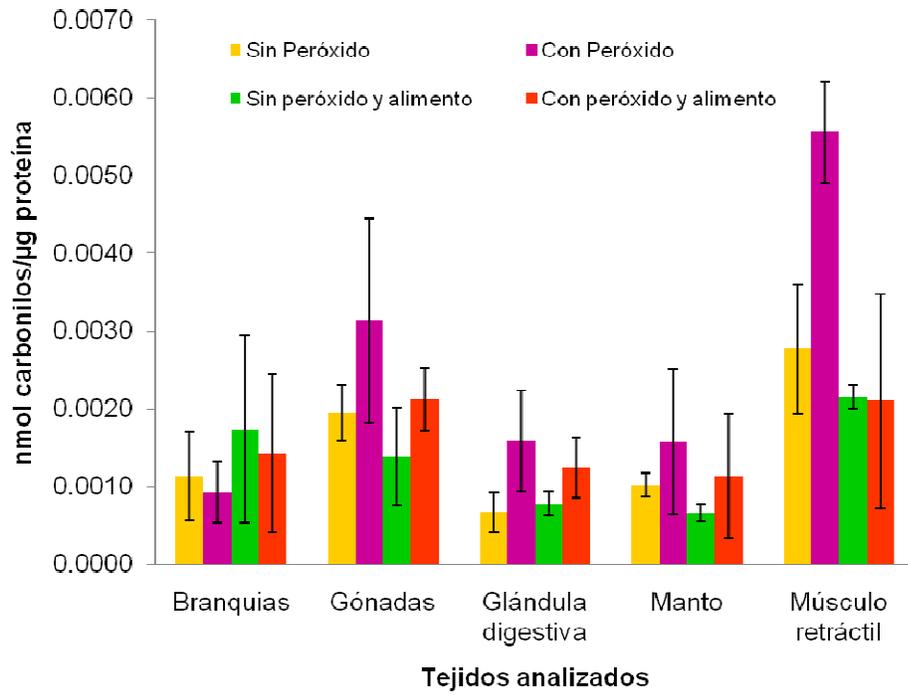


Figura 2. Oxidación de proteínas causada por peróxido de hidrógeno 100 μ M en diferentes tejidos de ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

5.1.2 Peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM

a) Biometrías

Se utilizaron 45 juveniles de ostión japonés de 7.22 ± 0.5 cm. Cada uno de los organismos utilizados se midió y pesó al inicio y final del experimento como se observa en la tabla 5. Esto se realizó con el objetivo de que la distribución de tamaños y pesos fuera uniforme en todos los tratamientos.

El porcentaje de mortalidad durante el experimento fue de 2.22%. Sólo un organismo de los 45 utilizados, no sobrevivió. Este organismo perteneció al bioensayo con 1 mM de peróxido de hidrógeno, por tanto, el porcentaje de mortalidad por tratamiento fue de:

SP, 0 mM H_2O_2 → 0 % de mortalidad, 100% de sobrevivencia

CP1, 1 mM H_2O_2 → 2.2 % de mortalidad, 97.8% de sobrevivencia

CP5, 5 mM H_2O_2 → 0% de mortalidad, 100% de sobrevivencia

Las branquias de los organismos de este tratamiento, no tenían la forma característica (lisa y extendida en toda la valva), sino que tenían burbujas distribuidas por toda la branquia que a su vez estaba compactada en el centro del organismo en forma de ondas, como se ve en la fotografía 1. Algunos organismos (en todos los tratamientos) tenían una alta carga de parásitos (platelmintos, poliquetos y anélidos) y otros restos en su interior, cuya fuente, probablemente el agua donde fueron cultivados.

Tabla 5. Biometría realizada a juveniles de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) para el bioensayo con peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM.

Tratamiento	# Organismo	Longitud (cm)	Peso total (g)	Peso concha f (g)	Peso blando i (g)	Peso blando f (g)
CP1-3	1	8.77	56	35.5	20.5	3
CP1-3	2	6.84	60	39	21	3.5
CP1-3	3	7.55	63.5	42	21.5	2.5
CP1-3	4	7.13	51.5	34.5	17	3
CP1-3	5	7.29	52	32.5	19.5	3
CP5-2	6	7.17	39	23.5	15.5	2
CP5-2	7	7.01	44.5	30.5	14	2
CP5-2	8	7.51	48	33.5	14.5	3
CP5-2	9	7.45	43.5	28	15.5	2
CP5-2	10	7.65	64	42	22	3
SP-1	11	6.85	60.5	39.5	21	2.5
SP-1	12	6.45	49	33	16	2.5
SP-1	13	7.19	59	37	22	2
SP-1	14	6.78	44.5	28.5	16	1.5
SP-1	15	6.78	60	40	20	2.5
SP-2	16	7.05	62	40.5	21.5	3.5
SP-2	17	7.26	58	41.5	16.5	3.5
SP-2	18	7.75	51	31	20	3
SP-2	19	6.67	47	30	17	2.5
SP-2	20	7.22	68.5	46.5	22	3.5
CP5-3	21	7.12	52.5	33	19.5	2
CP5-3	22	6.86	45.5	35	10.5	1
CP5-3	23	7.42	71	47	24	4
CP5-3	24	6.47	51.5	32.5	19	2
CP5-3	25	8.63	80.5	55.5	25	2.5
CP1-2	26	7.5	48.5	31.5	17	1
CP1-2	27	7.53	46.5	30.5	16	3
CP1-2	28	7.06	61	41	20	3.5
CP1-2	29	7.19	53.5	35	18.5	3.5
CP1-2	30	6.39	57	40.5	16.5	2
CP1-1	31	7.17	59	40	19	3.5
CP1-1	32	7.42	55.5	35.5	20	5.5
CP1-1	33	7.78	43	28.5	14.5	3
CP1-1	34	7.53	62.5	42.5	20	3.5
CP1-1	35	6.47	56	37	19	3.5
SP-3	36	7.5	57	39	18	2.5
SP-3	37	6.71	52	35	17	2.5
SP-3	38	7.13	51	34	17	3.5
SP-3	39	7.74	57.5	38	19.5	4.5
SP-3	40	7.38	63	41	22	3.5
CP5-1	41	7.72	52	34.5	17.5	2.5
CP5-1	42	6.42	58	36.5	21.5	3.5
CP5-1	43	6.81	48	31.5	16.5	1.5
CP5-1	44	7.1	46.5	30	16.5	2
CP5-1	45	7.42	49	32	17	3.5
PROMEDIOS		7.22	54.64	36.11	18.53	2.82
DS		0.504	8.180	5.881	2.875	0.880

Notación: SP → Sin peróxido; CP1 → Con peróxido 1 mM; CP5 → Con peróxido 5 mM; DS → Desviación estándar. Los números después del guión en las abreviaturas indican qué número del triplicado es.



Figura 3. Comparación entre las branquias de los tratamientos control 0 mM y 5 mM de peróxido de hidrógeno.

Izquierda, branquias normales. Derecha, branquias con burbujas y en forma de ondas al centro del organismo.

b) Calidad del agua

Con el objetivo de diagnosticar a tiempo si los organismos estaban siendo sometidos a un estrés diferente al del experimento, se monitoreó la calidad del agua, mediante los siguientes parámetros: el pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza carbonatada, salinidad, amonio, nitritos y fosfatos. En la Tabla 6 se observan los valores obtenidos para cada uno. En la primera dosificación de peróxido, el agua pasó de clara a ligeramente verde claro. Durante la segunda dosificación (a las 24 h), no se presentó este efecto.

c) Peroxidación de lípidos

La presencia de 1 y 5 mM de peróxido de hidrógeno no tiene un efecto significativo (ANOVA, $P < 0.05$) en los lipoperóxidos producidos en los diferentes tejidos del ostión japonés (*C. gigas*) en un mismo tratamiento ni entre tratamientos. Excepto entre la glándula digestiva y el músculo retráctil del tratamiento con peróxido de hidrógeno 1 mM, donde si se encontró diferencia estadísticamente significativa.

d) Oxidación de proteínas

La presencia de 1 y 5 mM de peróxido de hidrógeno no tiene un efecto significativo (ANOVA, $P < 0.05$) en la oxidación de proteínas en los diferentes tejidos del ostión japonés (*C. gigas*) en un mismo tratamiento ni entre tratamientos.

Tabla 6. Monitoreo de la calidad del agua durante el experimento con peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM, a las 0, 24 y 48 h.

	Parámetros							
	pH	T, °C	Oxígeno disuelto, mg/mL	Dureza, ppm	Salinidad, ppm	Amonia, mg/L	Nitritos, mg/L	Fosfatos, mg/L
Estanques	7.8	16.6	7.01	125.3	34	0.25	0	0.5
Inicial	7.8	17.8	7.92	143.2	33	0	0	0
Tratamientos								
0 h								
CP1-3	8	19	7.98	143.2	31	0.25	0	0
CP5-2	8	18.8	7.97	143.2	34	0.25	0	0
SP-1	8	19.1	7.69	143.2	34	0.25	0	0
SP-2	8	19	7.84	143.2	34	0.25	0	0
CP5-3	8	18.8	7.95	143.2	34	0.25	0	0
CP1-2	7.8	19.1	7.23	143.2	34	0.25	0	0
CP1-1	8	19.2	7.77	143.2	33	0.25	0	0
SP-3	7.8	19.4	7.64	143.2	33	0.25	0	0
CP5-1	8	19	7.86	143.2	34	0.25	0	0
Promedio	7.96	19.04	7.77	143.20	33.44	0.25	0.00	0.00
24 h								
CP1-3	7.8	19.2	8.02	143.2	33	1	0	0.25
CP5-2	8	18.8	8.55	143.2	33	2	0	0
SP-1	7.8	19.3	7.52	107.4	30	0.5	0.25	0.25
SP-2	7.8	19.2	7.53	143.2	33	2	0.5	0
CP5-3	7.8	19.2	9.17	125.3	34	0.5	0	0
CP1-2	8	19.5	7.78	107.4	34	1	0	0.25
CP1-1	8	19.5	7.31	143.2	33	2	0	0.25
SP-3	7.8	19.7	6.94	125.3	33	0.5	0.25	0
CP5-1	8	19.3	7.97	143.2	33	0.5	0	0
Promedio	7.89	19.3	7.9	131.3	32.89	1.11	0.11	0.11
48 h								
CP1-3	7.8	19.6	7.32	125.3	35	2	0.25	0.25
CP5-2	7.8	19.1	8.99	143.2	35	0.5	0	0
SP-1	8	19.6	7.83	143.2	35	4	1	0.25
SP-2	7.4	19.5	7.48	125.3	35	4	2	0
CP5-3	7.8	19.5	9.44	125.3	35	2	0	0.25
CP1-2	7.8	19.8	7.65	143.2	35	1	0	0.25
CP1-1	7.8	19.6	7.15	125.3	35	4	0.25	0.25
SP-3	7.8	19.8	7.44	125.3	35	1	1	0
CP5-1	7.8	19.5	8.39	125.3	35	0.5	0	0
Promedio	7.78	19.56	7.97	131.27	35.00	2.11	0.50	0.14
Prom. Gral.	7.9	19.3	7.9	135.2	33.8	1.2	0.2	0.1
DS	0.090	0.256	0.098	6.890	1.094	0.931	0.263	0.073

Notación: SP → Sin peróxido; CP1 → Con peróxido 1 mM; CP5 → Con peróxido 5 mM; DS → Desviación estándar. Los números después del guión en las abreviaturas indican qué número del triplicado es.

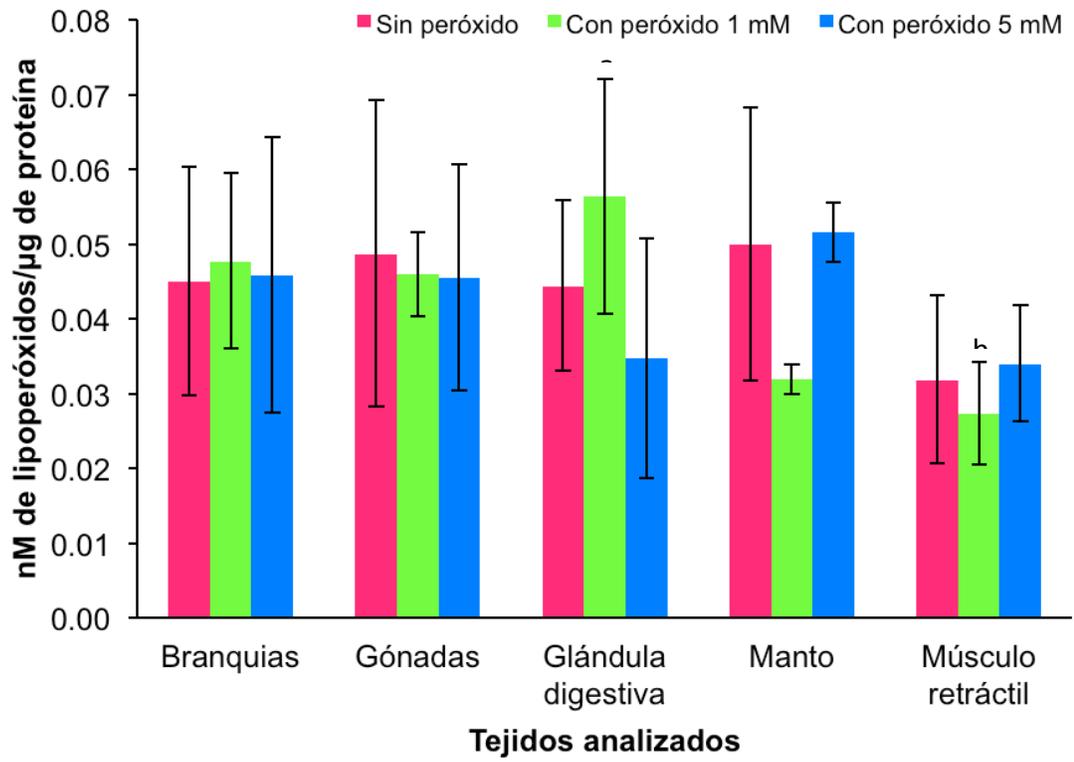


Figura 4. Peroxidación lipídica causada por el peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM en diferentes tejidos de ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

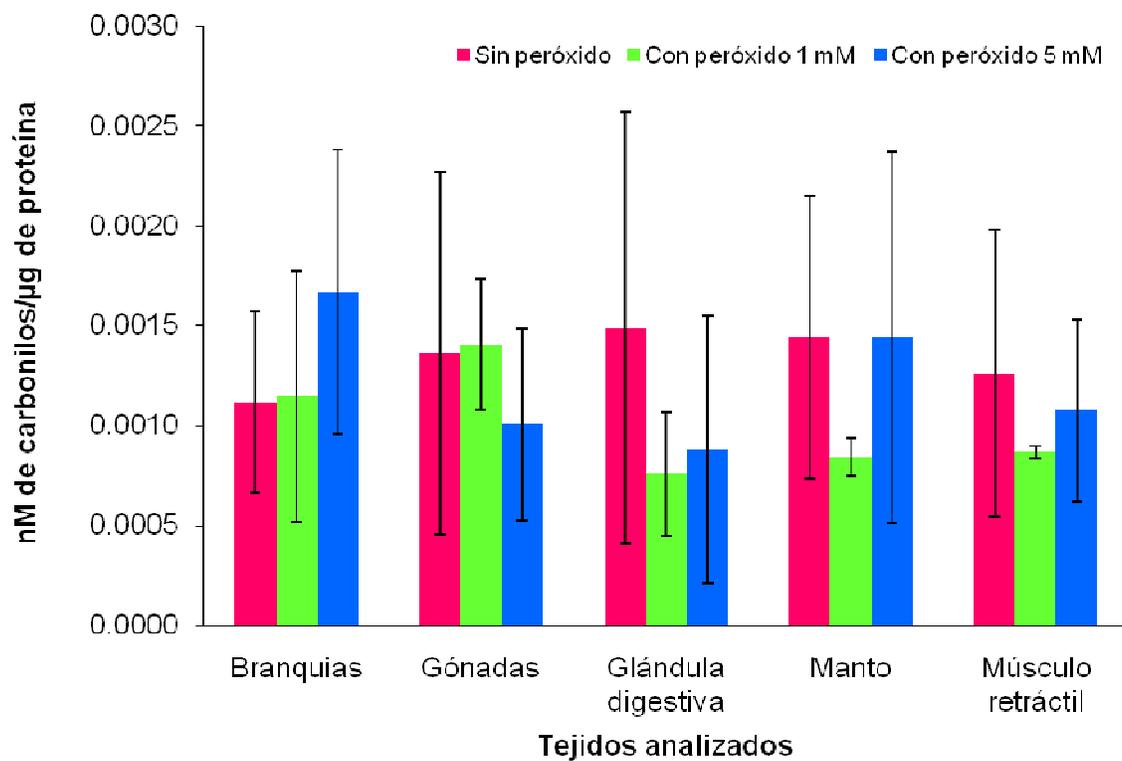


Figura 5. Oxidación de proteínas causada por el peróxido de hidrógeno 1 y 5 mM en diferentes tejidos de ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

5.2 Efecto de los nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados (MWCNT-COOH)

a) Biometrías

Se utilizaron 30 juveniles de ostión japonés de 6.44 ± 0.48 cm. Cada uno de los organismos utilizados se midió y pesó al inicio y final del experimento como se observa en la Tabla 7. Ésto se realizó con el objetivo de que la distribución de tamaños y pesos fuera uniforme en todos los tratamientos.

La mortalidad durante el bioensayo fue de 0%, es decir, se tuvo una sobrevivencia del 100%.

Los organismos del tratamiento con 20 ppm de nanotubos de carbono presentaron en su glándula digestiva un conglomerado negro de 1 a 2 mm de diámetro. Normalmente se presenta una “masa” verde pardusca que es el alimento procesado.

Algunos organismos (en todos los tratamientos) tenían una alta carga de parásitos (platelmintos, poliquetos y anélidos) y otros restos en su interior.

Tabla 7. Biometría realizada a juveniles de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) para el bioensayo con 20 ppm de nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados.

Tratamiento	# Organismo	Longitud (cm)	Peso total (g)	Peso concha f (g)	Peso blando i (g)	Peso blando f (g)
SN-1	1	6.58	45.5	32.5	13	4
SN-1	2	6.09	41	28	13	4.5
SN-1	3	6.44	31	21	10	3.5
SN-1	4	6.11	31.5	23	8.5	23
SN-1	5	6.52	37	25	12	6
CN-1	6	6.26	37.5	23.5	14	5.5
CN-1	7	6.77	48	34	14	3.5
CN-1	8	6.52	51.5	37	14.5	3.5
CN-1	9	6.19	40.5	27.5	13	4.5
CN-1	10	6.71	46.5	34	12.5	2
CN-3	11	6.47	35.5	25.5	10	3
CN-3	12	6.37	34.5	26.5	8	6
CN-3	13	7.07	44	24	20	2.5
CN-3	14	6.23	46.5	28	18.5	3
CN-3	15	6.53	30.5	29.5	1	6
SN-2	16	6.29	45.5	31	14.5	5
SN-2	17	5.89	36	21	15	2
SN-2	18	6.88	35.5	22.5	13	2
SN-2	19	5.96	31.5	23	8.5	3.5
SN-2	20	6.12	35.5	25	10.5	3.5
SN-3	21	7.84	40	26.5	13.5	2.5
SN-3	22	7.31	33.5	21	12.5	3
SN-3	23	6.17	31	16.5	14.5	2
SN-3	24	5.49	26	24	2	2.5
SN-3	25	5.79	28.5	19	9.5	4.5
CN-2	26	6.94	41.5	28	13.5	5
CN-2	27	6.27	38	26	12	3
CN-2	28	5.81	33.5	21	12.5	2.5
CN-2	29	6.59	36.5	22	14.5	2
CN-2	30	7.09	34.5	27	7.5	5
PROMEDIOS		6.44	37.60	25.75	11.85	4.28
DS		0.486	6.235	4.635	3.895	3.701

Notación: SN → Sin nanotubos; CN → Con nanotubos; DS → Desviación estándar. Los números después del guión en las abreviaturas indican que número del triplicado es.

Tabla 8. Monitoreo de la calidad del agua durante el experimento con 20 ppm de nanotubos de carbono de pared múltiple carboxilados, a las 0, 24 y 48 h.

	Parámetros							
	pH	T, °C	Oxígeno disuelto, mg/mL	Dureza, ppm	Salinidad, ppm	Amonia, mg/L	Nitritos, mg/L	Fosfatos, mg/mL
Estanques	8.2	18.6	6.19	143.2	35	0	0	1
Inicial	7.8	17.3	7.84	143.2	33	0	0	0
Tratamientos								
	0 h							
SN-1	7.4	17.2	7.38	143.2	33	0.25	0	0
CN-1	7.8	16.4	7.57	143.2	33	0.25	0	0
CN-3	7.8	17.5	7.96	143.2	33	0.25	0	0
SN-2	7.8	17.3	7.95	161.1	33	0.25	0	0
SN-3	7.8	17.4	7.96	143.2	34	0.25	0	0
CN-2	7.8	17.5	7.72	143.2	34	0.25	0	0
Promedio	7.73	17.22	7.76	146.18	33.33	0.25	0.00	0.00
	24 h							
SN-1	7.8	17.5	7.4	143.2	34	0.25	0	0.25
CN-1	7.8	16.9	7.72	143.2	34	0.25	0	0.25
CN-3	7.8	17.4	7.87	143.2	33	0.25	0	0.25
SN-2	7.8	17.4	7.5	143.2	33	0.25	0	0.25
SN-3	7.8	17.7	7.41	161.1	33	0.25	0	0.25
CN-2	7.8	17.6	7.65	143.2	33	0.25	0	0.25
Promedio	7.80	17.42	7.59	146.18	33.33	0.25	0.00	0.25
	48 h							
SN-1	7.8	18.2	7.32	143.2	33	1	0	0.5
CN-1	8	17.6	7.3	143.2	33	1	0	0.25
CN-3	8	17.9	7.47	161.1	34	1	0	0.25
SN-2	7.8	17.9	7.39	143.2	33	1	0	0.5
SN-3	8	18.1	7.34	161.1	33	1	0	0.25
CN-2	8	17.9	7.83	161.1	33	1	0	0.5
Promedio	7.93	17.93	7.44	152.15	33.17	1.00	0.00	0.38
Prom. Gral.	7.8	17.5	7.6	148.2	33.3	0.5	0.0	0.2
DS	0.102	0.370	0.158	3.445	0.096	0.433	0.000	0.191

Notación: SN → Sin nanotubos; CN → Con nanotubos; DS → Desviación estándar. Los números después del guión en las abreviaturas indican qué número del triplicado es.

c) Peroxidación de lípidos

La exposición a 20 ppm de MWCNT no causó alteración en la producción de lipoperóxidos, dado que los valores de éstos, se mantuvieron en el rango normal para el ostión japonés. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, comparado con los controles. Sin embargo, si hubo diferencias significativa entre la glándula digestiva y el músculo abductor

d) Oxidación de proteínas

En lo que respecta a la oxidación de proteínas en los tejidos, la exposición a 20 ppm de nanotubos de carbono no se alteró significativamente entre este tratamiento y el grupo control. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos o tejidos.

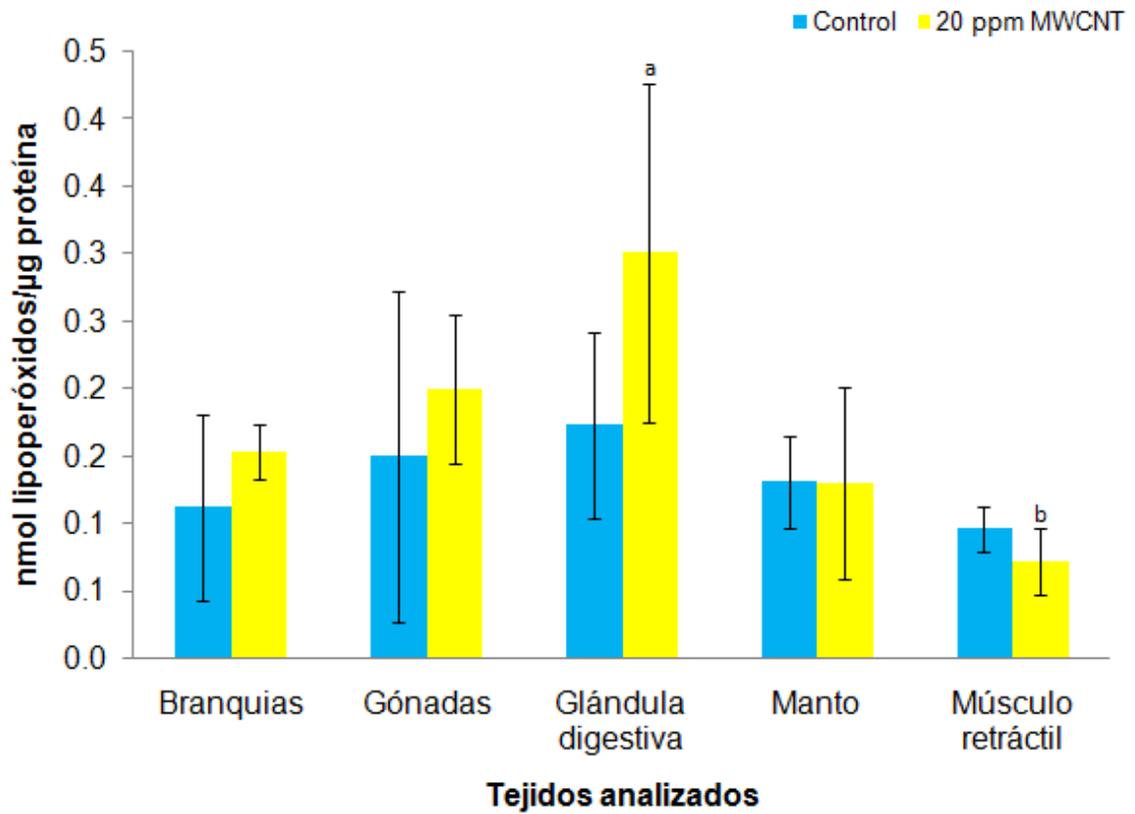


Figura 6. Peroxidación lipídica causada por 20 ppm nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) en diferentes tejidos de ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

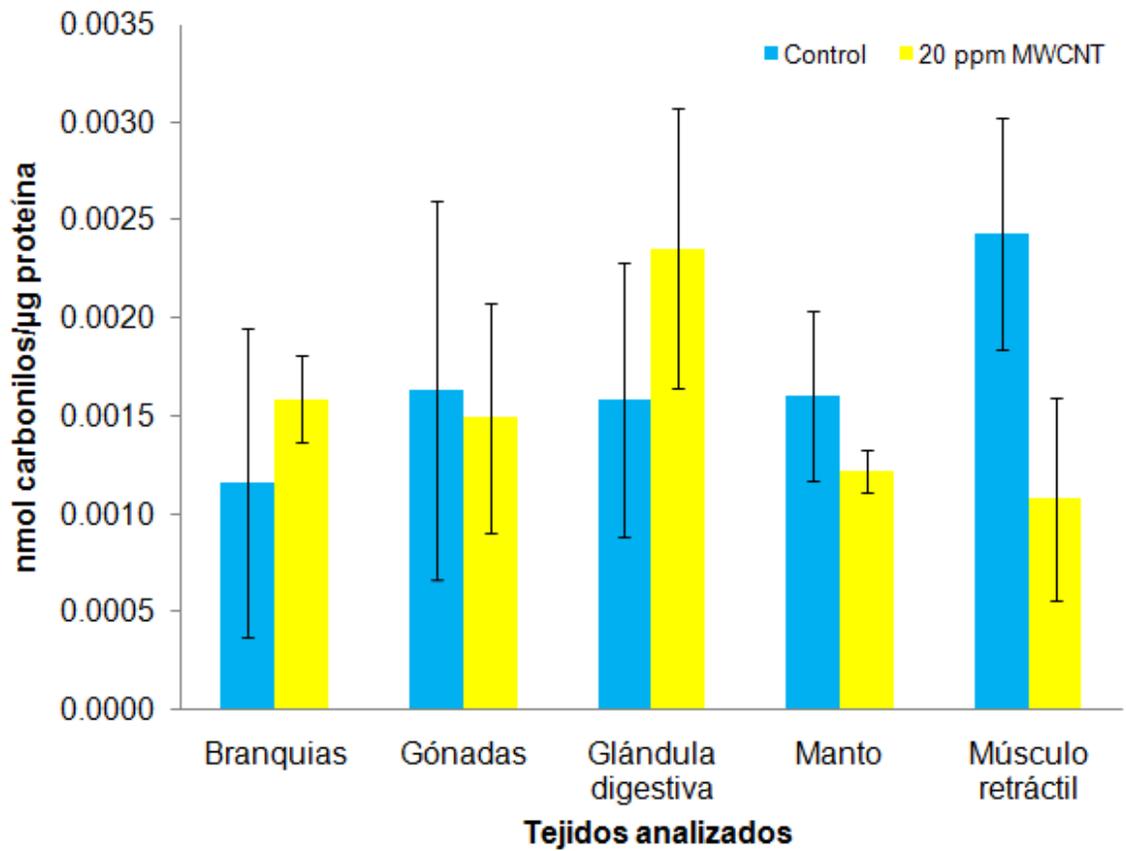


Figura 7. Oxidación de proteínas causada por 20 ppm de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) en diferentes tejidos de ostión japonés (*Crassostrea gigas*).

5.3 Discusión general

a) Biometrías

La talla de los 115 organismos utilizados en los tres bioensayos (7.01 ± 0.41 cm) garantiza una talla homogénea entre los organismos utilizados en los diferentes bioensayos para poder distinguir con mayor facilidad las posibles diferencias ocasionadas por los tratamientos.

En cuanto a la mortalidad, ésta fue de tan solo el 0.86%. Siendo uno organismo el único que no sobrevivió, perteneciente al tratamiento de 1 mM de H_2O_2 , que correspondió al segundo bioensayo.

b) Calidad del agua

Para los dos bioensayos con peróxido de hidrógeno (100 μ M, 1 y 5 mM) los parámetros fisicoquímicos mostraron la tendencia que se describe a continuación. El pH, temperatura y salinidad, se mantuvieron dentro de las condiciones óptimas requeridas para el mantenimiento del ostión japonés. Sin embargo, al analizar los demás parámetros como la dureza, se observó un decaimiento de la misma a las 24 y 48 horas del experimento. La disminución de la dureza está relacionada con la desmineralización del agua, que se da por la pérdida de iones, ocasionada a su vez por el incremento de fosfatos, que precipita los iones divalentes de Ca y Mg disueltos.

Los fosfatos se incrementan, al igual que el amonio y los nitritos, debido al metabolismo de los organismos, de la materia orgánica en descomposición,

como el alimento u otros organismos parásitos, tan comunes en el ostión japonés. El incremento de los nitritos y del amonio, también están relacionados con una filtración biológica inadecuada.

Como es sabido, los moluscos bivalvos son organismos filtradores, por lo que un estrés que altere el ritmo de filtración y la transferencia electrónica en la cadena respiratoria, como un estrés oxidativo, ocasionaría una filtración inadecuada, alterando directamente el incremento de nitritos y de amonio disueltos en el agua.

En lo que respecta al tratamiento con 20 ppm de MWCNT, el pH, temperatura y salinidad, se mantuvieron dentro de las condiciones óptimas requeridas para el ostión japonés. Sin embargo, caso contrario a los tratamientos con peróxido de hidrógeno, la dureza se incrementa, esto debido a la mineralización del agua. Los MWCNT, aún con agitación y aireación constantes, tienden a formar conglomerados en agua salada los cuales pueden precipitarse.

Esto está relacionado con la mineralización del agua, ya que forman interacciones iónicas con el Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} disueltos. Los conglomerados de nanotubos forman una especie de partícula coloidal inorgánica e hidrófoba, ya que estos adsorben los iones disueltos y forman micelas que se repelen entre sí debido a las cargas iónicas (Nowack y Bucheli, 2007; Wilkinson y Lead, 2007). Los fosfatos y amonio, se incrementaron, al igual que en los tratamientos con peróxido de hidrógeno, lo cual es normal ya que está relacionado, como se

mencionó anteriormente con el metabolismo de los organismos. Sin embargo, los nitritos se mantuvieron en el valor que se tenía al inicio del experimento y que corresponde a menos de 25 mg de nitritos por litro de agua (valor mínimo de detección de la técnica colorimétrica). Lo cual es interesante, puesto que el incremento de los mismos está relacionado con una mala filtración. Por otro lado, estos organismos no sufrieron hipoxia durante el experimento, ya que los valores de oxígeno se encontraban dentro del rango óptimo para el desarrollo del ostión japonés, con un valor promedio para todos los bioensayos de 7.75 mg de oxígeno disuelto por mL de agua (tablas 6 y 8).

. c) Peroxidación de lípidos

Como se observa en las Figura 1, no hay diferencias entre tejidos, ni entre tratamientos para el experimento con 100 μ M de peróxido de hidrógeno, motivo por el que se dedujo que esta concentración es muy baja para ocasionarles algún efecto notorio a los organismos.

Por tanto, se decidió incrementar 10 y 50 veces más la concentración del peróxido. En un segundo bioensayo se probó el efecto de 1 y 5 mM de H_2O_2 en los ostiones. Como se observa en la Figura 3, salvo entre la glándula digestiva y el músculo abductor (tratamiento con 1 mM de H_2O_2), entre los demás tejidos y tratamientos, no hay diferencias estadísticamente significativas.

Resulta interesante que 5 mM de peróxido de hidrógeno no haya provocado diferencias significativas en la producción de lipoperóxidos, mientras que 1 mM

si lo produjo, al menos en un tejido, comparado con el grupo control. Ésto, si se contrasta con que se utilizan 4.16 mM de peróxido de hidrógeno para inducir el desove de los ostiones en etapa reproductiva (¹Comunicación personal), podría estar relacionado con la capacidad de los moluscos bivalvos para generar una respuesta inmediata a concentraciones subletales del xenobiótico. Dicha respuesta involucra un mecanismo activo, como cerrar las valvas, para evitar el estrés tóxico, lo cual puede estar relacionado a su vez con la acumulación de contaminantes en la glándula digestiva (Fdil et al., 2006; Tedesco et al., 2010; Tran et al., 2003).

Carrillo (2012) encontró en el pez cebra, que la respuesta que generan 100 μM de H_2O_2 en un organismo es equivalente a 1 ppm de nanomaterial, considerando la producción de lipoperóxidos y proteínas oxidadas. Con base en esto, se incrementó la concentración de nanotubos de carbono 20 veces más que la cantidad propuesta inicialmente. De tal manera que se probaron 20 ppm de MWCNT en los ostiones y como se observa en la Figura 5, tampoco se observaron diferencias significativas entre tejidos o tratamientos, excepto nuevamente para la glándula digestiva y el músculo retráctil.

En lo que respecta al conglomerado negro encontrado en la glándula digestiva, se presume que son nanotubos de carbono ingeridos y acumulados en el aparato digestivo, lo cual está concuerda con lo reportado en otros moluscos

¹ Zaúl García-Esquivel. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, CP. 22860.

(*Mytilus edulis* y *Crassostrea virginica*), donde se encontraron los xenobióticos (nanopartículas de oro, poliéster de sacarosa, fullerenos C60) dentro de la glándula digestiva (Moore, 2006; Ringwood et al., 2009; Tedesco et al., 2010; Canesi et al., 2012; Lapresta-Fernández et al., 2012).

Está comprobado que la formación de conglomerados en el agua de mar, protege a los organismos marinos de la toxicidad del nanomaterial, ya que algunos organismos, como *Daphnia magna* (pulga de agua), mejillones y ostiones, asimilan mejor los conglomerados que las partículas individuales y los acumulan en su sistema digestivo como suspensiones acuosas para ser desechados metabólicamente (Roberts et al., 2007; Ward y Kach, 2009; Canesi et al., 2012; Petersen et al., 2011). Con base en esto, se relacionan los resultados obtenidos (figuras 3 y 5), en donde la mayor producción de lipoperóxidos se dio en la glándula digestiva en contraparte con la menor producción en músculo retráctil. Además, como se mencionó anteriormente, en los organismos expuestos a 20 ppm de MWCNT se encontró un conglomerado negro en la glándula digestiva. Esto sugiere que ésta acumulación en el sistema digestivo genera una respuesta del sistema antioxidante.

En los moluscos bivalvos, el sistema antioxidante comprende, enzimas como la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) (Power y Sheehan, 1996; Sheehan y Power, 1999; Lapresta-Fernández et al., 2012), además de la enzima oxidasa alternativa (AOX), descubierta recientemente en el ostión japonés y que tiene un papel importante en el

balance *redox* (Sussarellu et al., 2012). De éstas, la CAT, una enzima con capacidad antioxidante, es la que presenta 4 veces más actividad en la glándula digestiva que en las branquias. Mientras que en éstas últimas, la GPX es la que se encuentra en altas concentraciones (Sheehan y Power, 1996; Power y Sheehan, 1999).

La baja producción de lipoperóxidos tanto en los tratamientos control como en los expuestos a 20 ppm de MWCNT está relacionada, quizás, con la alta eficiencia de estos organismos filtradores para secuestrar o inactivar a las especies reactivas de oxígeno. Con la absorción de los conglomerados en la glándula digestiva son sometidos a la alta actividad catalítica antioxidante que se encuentra en este tejido. Ésta relación se encontró en otros moluscos bivalvos como *C. virginica* y *M. edulis*, donde estos organismos tienden a acumular en el sistema digestivo los conglomerados de nanomateriales, incrementando la producción de lipoperóxidos y al mismo tiempo su actividad catalasa.

Es gracias a este potente sistema antioxidante, que la toxicidad encontrada es leve (Tedesco et al., 2010; Canesi et al., 2010; Ringwood et al., 2010; Canesi et al., 2012; Lapresta-Fernández et al., 2012).

d) Oxidación de proteínas

Como se observa en las Figuras 2, 4 y 6, en ningún tratamiento de los bioensayos realizados (0 y 100 μ M, 0, 1 y 5 mM, 0 y 20 ppm MWCNT) se

encontraron diferencias significativas que orienten a suponer una respuesta al estrés oxidativo utilizando este organismo.

El manto, músculo retráctil y las branquias están constituidos mayormente por proteínas y es en éstas, en donde se da una elevada síntesis de las mismas, ya que al constituir el 11% del peso húmedo total del organismo (Trevisan et al., 2012), el área de contacto con el medio se incrementa y la absorción de xenobióticos es mayor, principalmente de metales (Gue et al., 2008). Es en éstas en donde la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPX) y la superóxido dismutasa (SOD) tienen mayor actividad (Power y Sheehan, 1996; Sheehan y Power, 1996; Trevisan et al., 2012). Ésta última es la encargada de mantener los niveles de glutatión reducido y glutatión disulfuro (GSH/GSSG) estables, en donde un desequilibrio entre ellos indica la presencia de estrés oxidativo (Lapresta-Fernández et al., 2012). Además, en el ostión japonés, la enzima GPX es selenio dependiente (Se-GPX) y es capaz de catalizar la reducción tanto de peróxido orgánico como inorgánico (Gue et al., 2008).

La baja oxidación de proteínas, tanto en los tratamientos control como en los tratamientos con peróxido de hidrógeno y MWCNT, podría estar relacionada con el eficiente sistema antioxidante de los organismos. La elevada presencia de Se-GPX en branquias (Gue et al., 2008) y la capacidad de los organismos bivalvos de acumular los conglomerados de nanomateriales en su sistema digestivo para ser desechados posteriormente (Roberts et al., 2007; Ward y

Kach, 2009; Canesi et al., 2012; Petersen et al., 2011). Además de la alta actividad catalasa en la glándula digestiva (Sheehan y Power, 1996; Power y Sheehan, 1999), forman un complejo antioxidante potente que protege las proteínas, evitando su oxidación y consecuente alteración de su estructura secundaria (Ochoa y González, 2008).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que la glándula digestiva es el principal destino de los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), ésto se debe a que en el agua de mar forman conglomerados que son fácilmente acumulados por el aparato digestivo para ser desechados en forma de heces.

No hay diferencias estadísticamente significativas para afirmar que 20 ppm de nanotubos de carbono causan un estrés oxidativo importante en los ostiones, lo cual está en consonancia con otros nanomateriales probados en moluscos bivalvos como *Mytilus edulis* y *Crassostrea virginica* (Tedesco et al., 2010; Canesi et al., 2010; Ringwood et al., 2010; Canesi et al., 2012; Lapresta-Fernández et al., 2012). Sin embargo, el efecto contrario se encontró en otros organismos como trucha arcoíris (Federici et al., 2007; Smith et al., 2007) y en pez cebra (Carrillo, 2012), donde los nanomateriales causaron altos niveles de estrés oxidativo.

Los organismos filtradores tienen altamente desarrollados los procesos para la internalización celular de partículas a nano y micro-escala, por endo- y fagocitosis, que son esenciales para las funciones fisiológicas fundamentales como la digestión intracelular y la inmunidad celular (Canesi et al., 2012). En su ambiente natural filtran grandes volúmenes de agua, procesando microalgas, bacterias, sedimentos, partículas y nanopartículas naturales, acumulando diferentes compuestos químicos en sus tejidos (Gue et al., 2008; Lanceleur et

al., 2011; Canesi et al., 2012). Esto podría explicar la alta eficiencia de los sistemas de defensa de estos organismos ante los efectos potenciales de las nanopartículas.

Independientemente que los ostiones y otros moluscos bivalvos son utilizados como bioindicadores de la contaminación del agua, especialmente de metales pesados (Gagnaire et al., 2004; Moraga et al., 2005), los resultados de éste estudio muestran que gracias al potente sistema antioxidante, la producción de lipoperóxidos y la oxidación de proteínas no pueden ser utilizados como biomarcadores para monitorear la presencia de nanotubos de carbono en los cuerpos acuáticos.

RECOMENDACIONES

Son necesarios estudios que involucren una mayor exposición a las nanopartículas para observar el efecto de la presencia de partículas a escala nanométrica.

Por otro lado, es importante evaluar la expresión de las enzimas del sistema antioxidante en presencia de nanotubos, la expresión de las mismas se podría utilizar como marcador de contaminación.

Se puede hipotetizar que la expresión de estas proteínas se dispara con la presencia de los nanotubos reduciendo así el efecto de la producción de especies reactivas de oxígeno. De manera específica, la actividad catalasa tiene potencial para ser utilizada como biomarcador.

REFERENCIAS

- AHAMED, M., M. AlSalhi y M. K. J. Siddiqui, 2010. Silver nanoparticles applications and human health. *Clinica Chimica Acta* 411, 1841-1848.
- ARIAS Cerón, J.S., M.P. González Araoz, A. Bautista Hernández, J.F. Sánchez Ramírez, J.L. Herrera Pérez y J.G. Mendoza Álvarez, 2012. "Semiconductor nanocrystals of InPaZnS: Synthesis and characterization". *Superficies y Vacío*, 25, 134-138.
- BALDRÁN, Q.R., G.I. Romero Villegas, A.M. Mendoza Wilson y R. Sotelo Mundo, 2008. "Nanotubos de carbono y bionanotecnología". *Interciencia* 33, 331-336.
- BHATT, I. y B. N. Tripathi, 2011. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere*. 82, 308–317.
- BILBERG, K., H. Malte, T. Wang y E. Baatrup, 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*. 96, 159-165.
- BOCZKOWSKI, J. y S. Lanone, 2012. Respiratory toxicities of nanomaterials — A focus on carbon nanotubes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64, 1694–1699.
- CANESI, L. R. Fabbria, G. Galloa, D. Vallottob, A. Marcominib y G. Pojanab, 2010. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquatic Toxicology*. 100, 168–177.

- CANESI, L., C. Ciacci, R. Fabbri, A. Marcomini, G. Pojana y G. Gallo, 2012. Bivalve mollusks as an unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*. 76, 16-21.
- CARRILLO Vital, Y. y R. Vázquez-DuhalY.,t, 2012. “Monitoreo de estrés oxidativo causado por nanopartículas en pez cebra (*Danio rerio*) usando la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos como biomarcadores”. Tesis de licenciatura. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. Escuela de ingeniería ambiental.
- CATTANEO, A., R. Gornati, M. Chiriva-Internati y G. Bernardini, 2009. Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. *Invertebrate Survival Journal*. 6, 78-97.
- ELSAESSER, A. y C. V. Howard, 2012. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64, 2, 129-137.
- FABREGA, J., S.N. Luoma, C.R. Tyler, T.S. Galloway y J.R. Lead, 2011. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environmental International*. 37, 517-531.
- FAIRBAIRN, E., A. A. Keller, L. Mädler, D. Zhou y S. Pokhrel, 2011. Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. *Journal of Hazardous Materials*. 192, 1565-1571.
- FAO, 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento técnico de pesca 471. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés). Roma 2006.
- FDIL, M. A., A. Moubad, A. Outzourhit, A. Benhra, A. Maarouf y J. C. Pihan, 2006. Valve movement response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to

metals (Cu, Hg, Cd and Zn) and phosphate industry effluents from Moroccan Atlantic coast. *Ecotoxicology*. 15, 477-486.

FEDERICI, G., B. J. Shaw y R. D. Handy, 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*. 84, 415-43.

GAGNAIRE, B., H. Thomas-Guyon y T. Renault, 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 501-512.

GAY, C.A. y J.M. Gebicki, 2003. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylene orange method. *Analytical Biochemistry*. 315, 29-35.

GÓNGORA-GÓMEZ, A. M., M. García-Ulloa, J.A. Hernández-Sepúlveda y A.L. Domínguez-Orozco, 2012. Crecimiento del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1975) cultivado en el estero La Piedra, Sinaloa, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 16(2):91-104.

GUE, P., Y. Ki Choi y C. Young Choi, 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 147, 460–469.

HIRLEKAR, R., M. Yamagar, H. Garse, M. Vij y V. Kadam, 2009. Carbon nanotubes and its applications. A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol.2 Issue 4, 17-27.

HU, J., Z-S. Liu, S. Thang y M. He, 2007. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on the growth and p53/c-Myc protein expression of implanted hepatic VX₂

- tumor in rabbits by intravenous injection. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 13, 2798-2802.
- HUSSAIN, S.M., K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss, y J. J. Schalger, 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*. 19, 975-983.
- IJIMA, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. 354(6348):56–8.
- KIM, S., J. I. Choi, J. Choi, K. H. Chung, K. Park, J. Yi y D. Y. Ryu, 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro*. 23. 1076-1084.
- KLAINE, S. J., P. J. J. Álvarez, G. E. Batley, T. F. Fernández, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin y J. R. Lead, 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 27, No. 9, pp. 1825–1851.
- KLAPER, R., D. Arndt, K. Setyowti, J. Chen y F. Goetz, 2010. Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 100, 211–217.
- LANCELEUR, L., J. Schäfer, J.F. Chiffolleau, G. Blanc, D. Auger, S. Renault, M. Baudrimont y S. Audry, 2011. Long-term records of cadmium and silver contamination in sediments and oysters from Gironde fluvial-estuarine continuum – Evidence of changing silver sources. *Chemosphere*. 85, 1299-1305.
- LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A., A. Fernández y J. Blasco, 2012. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*, 32, 40-58.

- LIN, Y., S. Taylor, H. Li, K. A. S. Fernando, L. Qu, W. Wang, L. Gu, B. Zhou y Y.P. Sun, 2004. Advances toward bioapplications of carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry*. 14, 527-541.
- MALLICK, K. y A. M. Strydom, 2013. Biophilic carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 310-318.
- MENDOZA Uribe, G. y J.L. Rodríguez-López, 2007. “La nanociencia y la nanotecnología: Una revolución en curso”, *Perfiles latinoamericanos*, 29, 161-186.
- MIURA, N. y Y. Shinohara, 2009. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 390, 733-737.
- MONTAZERI, N., R. Jahandideh, E. Biazar, 2011. Synthesis of fluorapatite–hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations. *Internacional Journal of Nanomedicine*. 6, 197–201.
- MOORE, M.N. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?. *Environment International*. 32, 967-976.
- MORAGA, D., A. Meistertzheim, S. Tanguy-Royer, I. Boutet, A. Tanguy, A. Donval, 2005. Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): An immunohistochemical approach. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 141, 151 – 156.
- NOUROOZ-ZADEH, J., J. Tajaddini-Sarmandi y S. P. Wolff, 1994. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analytical Biochemistry*. 220, 403-409.

- NOWACK, B. y T. D. Bucheli, 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*. 150, 5-22.
- OBERDÖRSTER, E. 2004. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives*. 112, 1058-1062.
- OCHOA, D. M. y J. F. González, 2008. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista Medico Veterinaria Zootecnista*. 55, 115-126.
- OVIEDO, M., O. Contrera, C.E. Rodríguez, Z.S. Macedo, G.A. Hirata, J. McKittrick, 2012a. Photo- and radioluminescence characteristics of bismuth germanate nanoparticles by sol-gel and pressure-assisted combustion synthesis. *Optical Materials* 34, 1116-1119.
- OVIEDO, M., O. Contreras, R. Vázquez-Duhalt, G.G. Carbajal-Arizaga,, G. A. Hirata,, J. McKittrick, 2012b. Photoluminescence of Europium-Activated Hydroxyapatite Nanoparticles in Body Fluids. *Science of Advanced Materials*. Vol. 4. No. 5/6. 1-5.
- PERALTA-VIDEA, J.R., L. Zhao, M. L. López-Moreno, G. De la Rosa, J. Hong y J. L. Gardea-Torresdey, 2011. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. *Journal of Hazardous Materials*. 186,1-15.
- PETERSEN, E.J., R. A. Pinto, D. J. Mai, P.F. Landrum y W. J. Weber, 2011. Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Science Technology*. 45, 1133-1138.

- POWER, A. y D. Sheehan, 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 114, 99-103.
- POWERS, C.M. J. Yen, E. A. Linney, F. J. Seidler y T. H Slotkin, 2010. Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): Persistent effects on larval behavior and survival. *Neurotoxicology and Teratology* 32, 391-397.
- PRASEK, J., J. Drbohlavova, J. Chomoucka, J. Hubalek, O. Jasek, V. Adam y R. Kizek, 2011. Methods for carbon nanotubes synthesis. Review. *Journals of Material Chemistry*. 21, 15872.
- QUINTANA, M., X. Ke, G. Van Tendeloo, M. Meneghetti, C. Bittencourt y M. Prato, 2010. "Light-Induced Selective Deposition of Au Nanoparticles on Single-Wall Carbon Nanotubes", *ACS Nano*, 4, 6105-6113.
- RINGWOOD, A.H., N.L. Olyachenko y D. L. Carrol, 2009. Fullerene exposures with oysters: embryonic, adult, and cellular responses. *Environmental Science Technology*.43, 7136–7141.
- ROBERTS, A. P., A.S. Mount, B. Seda, J. Souther, R. Oiao, S. Lin, P. Chun Ke, A. M. Rao y S. J. Klaine, 2007. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science Technology*. 41, 3025-3029.
- RUEKBERG, B. y E. Rossoni, 2005. An improved preparation of 2,4-Dinitrophenylhydrazine reagent. *Letters to Journal of Chemical Education*. 82, 1310.
- SCHUBERT, D., R. Dargusch, J. Raitano, S-W Chan. 2006. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 342, 86–91.

- SHEEHAN, D. y A. Power, 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 123, 193–199.
- SHVEDOVA, A.A., A. Pietroiusti, B. Fadeel y V. Kagan, 2012. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 261, 121–133.
- SINGH, N., B. Manshian, G. J. S. Jenkins, S. M. Griffiths, P. M. Williams, T. G. G. Maffei, C. J. Wright y S. H. Doak, 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 30, 3891-3914.
- SMART, S.K., A.I. Cassady, G.Q. Lu y D.J. Martin, 2006. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*. 44, 1034–1047.
- SMITH, C.J., B. Shaw y R. D. Handy, 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*. 82, 94-109.
- SRIWICHAI, P., F. M. Williams, C. Lye, A. Silmon y E. Mutch, 2010. An investigation of the toxicity of silver nanoparticles to HL60 and Jurkat cells *in vitro*. *British Toxicology Society Abstracts/Toxicology*. 278, 341-378.
- SUMIO, L., 1991. “Helical microtubules of graphitic carbon”. *Letters to Nature*, 354, 56-58.
- SUSSARELLU, R., C. Fabioux, M. Camacho Sanchez, N. Le Goïc, C. Lambert, P. Soudant y D. Moraga, 2012. Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 412, 87-95.

- TEDESCO, S., H. Doyle, J. Blasco, G. Redmond y D. Sheehan, 2010. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151, 167-174.
- TEOW, Y., P.V. Asharani, M. Prakash Hande y S. Valiyaveetti, 2011. "Health impact and safety of engineered nanomaterials", *Chemical Communications*. 47, 7025-7038.
- TRAN, D., P. Ciret, A. Ciutat, G. Durrieu y J.C. Massabuau, 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 914–920.
- TRAN, N., T.J., Webster, 2009. Nanotechnology for bone materials. *Nanobiotechnology and nanomedicine*. 1, 3, 336-351.
- TREVISAN, R., M. Arl, C. Lopes Sacchet, C. Severino Engel, N. Maria Danielli, D. Ferraz Mello, C. Brocardo, A.F. Maris y A.L. Dafre, 2012. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. *Aquatic Toxicology*. 108, 85-93.
- WARD, J. E. y D. J. Kach, 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research*. 68, 137–142.
- WILKINSON, J.R. y J.R. Lead, 2007. Environmental colloids and particles: Behaviour, Separation and Characterisation. *IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*, vol. 10. 701.

WONG, K.K.Y., J. Tian, C.H. Ho, C.N. Lok, W.Y. Yu, C.M. Che, J.F. Chiu y P.K.H. Tam, 2007. Topical delivery of silver nanoparticles promote wound healing. *ChemMedChem.* 2, 129-136.