CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS S.C.

CITOTOXICIDAD Y MECANISMOS DE TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS EMERGENTES.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS Y TÉCNOLOGIA AMBIENTAL

PRESENTA:

MC Adriana Chávez Calderón

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. María Antonia Luna Velasco

Dr. Erasmo Orrantia Borunda

Chihuahua, Chih., Septiembre de 2016.

CONTENIDO

RESUMEN 1
ABSTRACT 3
1. INTRODUCCIÓN 5
2. ANTECEDENTES 7
2.1. Nanotecnología 7
2.2. Clasificación de los nanomateriales 8
2.2.1. Nanomateriales orgánicos 8
2.2.2. Nanomateriales inorgánicos 9
2.3. Nanopartículas inorgánicas 10
2.4. Aplicaciones de nanopartículas inorgánicas 13
2.4.1. Nanopartículas de óxido de cobre 14
2.4.2. Nanopartículas de óxido de estaño 15
2.4.3. Nanopartículas de Hierro elemental y Magnetita. 16
2.5. Toxicidad de nanomateriales. 17
2.5.1. Factores de toxicidad de las NPs inorgánicas 20
2.6. Mecanismos de toxicidad 20
2.6.1. Disolución de iones 21
2.6.2. Daño a la membrana 22
2.6.3. Producción de especies reactivas de oxígeno 22
2.7. Modelos biológicos ambientales 23
2.7.1. Bacterias Gram positivas y Gram negativas 23
2.7.2. Levaduras 26
3. JUSTIFICACIÓN 27
4. HIPÓTESIS 27
5. OBJETIVOS 27
5.1. Objetivo general 27
5.2. Objetivos particulares 27
6. MATERIALES Y METODOS 28

6.1. Nanopartículas inorgánicas 28
6.1.1. Síntesis de NPs de CuO 28
6.1.2. Síntesis de NPs de SnO_2 29
6.1.3. Nanopartículas de Fierro y Magnetita 29
6.3. Caracterización de nanopartículas. 30
6.4. Evaluación de toxicidad de nanopartículas 32
6.4.1. Preparación de los microorganismos para la exposición a las NPs 32
6.4.2. Ensayos de exposición a las nanopartículas 32
6.4.3. Técnica de conteo de micro gota (Milles-Misra) 32
6.4.4. Ionización de nanopartículas 33
6.4.5. Estabilidad de dispersiones de NPs de SnO_2 34
6.4.6. Toxicidad de Sn^{4+} ion en *B. subtilis* 34
6.4.7. Determinación de daño a la membrana 34
6.4.8. Análisis de imágenes de microscopía confocal 35
6.4.9. Análisis estadístico 36
6.4.10. Daño estructural y composición de células por MEB 36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37
7.1. Síntesis de las nanopartículas inorgánicas 37
7.1.1. Nanopartículas de CuO 37
7.1.2. Nanopartículas de SnO_2 37
7.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas inorgánicas 38
7.3. Estabilidad de las nanopartículas en los medios biológicos 41
7.4. Toxicidad de nanopartículas inorgánicas 43
7.4.1. Toxicidad de NPs de Fe° y Fe_3O_4 44
7.4.2. Toxicidad de NPs de CuO 45
7.4.3. Toxicidad de NPs de SnO_2 46
7.5. Mecanismos de toxicidad de las NPs con efecto tóxico 49
7.5.1. Mecanismo de toxicidad de las NPs de CuO 49
7.5.2. Mecanismo de toxicidad de NPs de SnO_2 51
7.6. Nanopartículas de SnO_2 dopadas 58

8. CONCLUSIONES 62
9. RECOMENDACIONES 62
10. REFERENCIAS..... 63

Índice de figuras

Fig 1 Clasificación de los nanomateriales de acuerdo a su composición (Peralta-Videa, et al., 2011) 7

Fig 2 Estructura de fulereno C60 “Buckministerfullerene” (Yadav and Kumar, 2008) 8

Fig 3 Estructuras de nanotubos de carbono de capa simple **(a)** doble **(b)** y multicapa **(c)** (Majumder, 2015).....9

Fig 4 Solución de puntos cuánticos de CdSe bajo una lámpara de UV (Tian et al., 2016). 9

Fig 5 Imagen de MET de nanopartículas de Cu..... 10

Fig 6 Patrón de EDS y composición elemental de nanopartículas de CuO 11

Fig 7 Espectro de difracción de rayos X de nanopartículas de CuO (A.S. et al., 2010). 11

Fig 8 Distribución del tamaño de las partículas en dispersión 12

Fig 9 Aplicaciones de nanopartículas inorgánicas en diversas áreas 14

Fig 10 Imagen de microscopia electrónica de transmisión de nanopartículas de CuO (Rahnama and Gharagozlou, 2012) 15

Fig 11 Imagen de microscopía electrónica de transmisión de NPs de SnO_2- Fe (Tirado et al., 2010) 16

Fig 12 Imagen de microscopía electrónica de barrido de NPs de Fe_3O_4 16

Fig 13 Factores que influyen en la toxicidad de las nanopartículas 20

Fig 14 Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas en bacterias 21

Fig 15 Estructura de la membrana celular de las bacterias **(a)** Gram positiva y **(b)** Gram negativa. 22

Fig 16 Imagen de microscopia óptica de la bacteria Gram negativa *E. coli*..... 25

Fig 17 Imagen de microscopia óptica de las bacterias Gram positivas *B. subtilis* **(A)** y *S. aureus* **(B).** 25

Fig 18 Imagen de microscopia electrónica de barrido de la levadura *S. cerevisiae*2

Fig 19 Imagen de MET **(a)**, composición elemental **(b)** y fase cristalina **(c)** de las nanopartículas de CuO 39

Fig 20 Viabilidad celular de *B. subtilis* **(A)** y *E. coli* **(B)** en función del tiempo con diferentes concentraciones de NPs de CuO (mg/L): 100 (●), 400(◆), 600 (▲) y 800 (■) 46
Fig 21 Viabilidad celular de *B. subtilis* en función del tiempo con diferentes concentraciones de NPs de SnO_2 (mg/L): 200 (●), 500(◆), 800 (▲) y 1000 (■). 47
Fig 22 Concentración de iones Cu^{2+} de NPs de CuO en los medios LB **(A)** y YPD **(B)** 50
Fig 23 Viabilidad celular de *B. subtilis* **(a)** y concentración de iones Cu^{2+} **(b)** de NPs de CuO en el medio NaCl 0.8% 50
Fig 24 Ion soluble de Sn^{4+} de NPs SnO_2 E2 en medio el LB 51
Fig 25 Viabilidad celular de *B. subtilis* expuesto a diferentes concentraciones del ion Sn^{4+} (24 h)..... 52
Fig 26 Fracción dispersa (sobrenadante) de las dispersiones de NPs de SnO_2 en medio LB 53
Fig 27 Imágenes de microcopia confocal de células de *B. subtilis* tenidas con Syto9 (colorante verde, sin daño en la membrana) y PI (colorante rojo, daño en la membrana). Células comprometidas se tiñen de color amarillo y naranja. Células no expuestas **(A)** y las células expuestas a 1000 mg/L de E2 **(B)**, E40 **(C)** y F800 **(D)** NPs de SnO_2 54
Fig 28 Efecto de la exposición a NPs de SnO_2 en el daño de la membrana de la célula de *B. subtilis*. Se obtuvieron los porcentajes de células vivas, muertas y comprometidas mediante el conteo de células realizadas en imágenes de microscopia confocal 56
Fig 29 Imágenes de MEB de las células *B. subtilis*: muestras de las células no expuestas se incubaron de 0 y 24 h (**A** y **C**, respectivamente) y las células expuestas a 1000 mg/L de NPs SnO_2 E2 para 0 y 24 h (**B** y **D**, respectivamente) 57
Fig 30 Imagen de MEB **(A)** y la composición elemental **(B)** células de *B. subtilis* expuesta a 1000 mg/L de NPs SnO_2 E2 (EDS)..... 58
Fig 31 Espectro de difracción de rayos X de NPs de SnO_2 dopadas (Tirado-Guízar et al., 2015) 59

Índice de Tablas

Tabla 1 Estudios de nanotoxicidad en microorganismos 18

Tabla 2 Características fisicoquímicas de las NPs inorgánicas 40

Tabla 3 Características de las Nanopartículas en los medios biológicos..... 43

Tabla 4 Efecto tóxico de las NPs inorgánicas 44

Tabla 5 Caracterización fisicoquímica de NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar 59

Tabla 6 Características de las NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar en los medios biológicos. 60

Tabla 7 Efecto tóxico de las NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar en diferentes modelos biológicos 61

AGRADECIMENTOS

Doy gracias a Dios por haberme permitido cumplir esta meta profesional.

Gracias al centro de investigación en materiales avanzados (CIMAV), por ser una institución emprendedora.

Gracias al CONACyT el apoyo económico el tiempo en el que se llevó a cabo la investigación

Gracias a maestros, técnicos de laboratorio, compañeros de clase, por ser parte de este proceso de formación.

Gracias a mis directores de tesis Dra. Antonia Luna y Dr. Erasmo Orrantia, por compartir sus conocimientos y su orientación en este proceso de crecimiento profesional.

El desarrollo de un proyecto de investigación, no se puede catalogar como algo fácil, lo importante es el disfrutar de cada momento de la investigación, con el apoyo incondicional de mis amigos y familia que siempre estuvieron ahí, **GRACIAS.**

Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma

“Julio Cortazar”.

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
DDL o DLS	Dynamic light scattering
DRX	Difracción de rayos X
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva
IC_{50}	Concentración inhibitoria media
LB	Luria Bertani
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
NMs	Nanomateriales
NPs	Nanopartículas
PI	Yoduro de propidio/Propidium iodide
PG	Peptidoglicano
ERO/ROS	Especies reactivas de oxígeno/Reactive oxygen species
TH	Tamaño hidrodinámico
UFC	Unidades formadoras de colonia
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose

RESUMEN

El aumento en las aplicaciones de nanopartículas en la industria, conlleva a generar su liberación en el medio ambiente y por lo tanto la interacción con los sistemas biológicos, ocasionando un posible efecto tóxico.

En el presente estudio se evaluó el efecto tóxico de 5 nanopartículas (CuO, SnO_2, Fe° y Fe_3O_4) con aplicaciones en diversas áreas. La toxicidad se determinó en modelos biológicos de importancia ambiental como bacterias (Gram positivas y negativas) y levaduras. Previo a la evaluación de la toxicidad las nanopartículas (NPs) fueron caracterizadas por diversas técnicas; difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido y trasmisión (MEB y MET), en los medios biológicos se midió el tamaño hidrodinámico y el potencial Z. La viabilidad celular se determinó partiendo de un inoculo inicial de $1x10^9$ UFC/mL con 24 h de exposición a NPs (100-1000 mg/L), como control se usaron células sin exposición. Los mecanismos de toxicidad fueron definidos por medio de microscopía confocal, MEB y la cuantificación del ion soluble.

La caracterización de las NPs mostró en su mayoría formas esféricas (2-85 nm) y una forma tipo flor (800 nm), así como una alta pureza. Los tamaños hidrodinámicos en los diferentes medios fueron en promedio de 149-1105 nm y la carga superficial fue negativa en un rango de -20 a -30 mV. En la exposición a las NPs de CuO se presentó un efecto tóxico a partir de la concentración de 600 mg/L con un tiempo de exposición 2 h (IC_{50} >400 mg/L) en la bacteria Gram positiva *B. subtilis.* El mecanismo de toxicidad de estas NPs fue la ionización de Cu^{2+} en el medio LB. La exposición a las NPs de SnO_2 E2 afecto la viabilidad de *B. subtilis* a partir de una concentración de 500 mg/L (IC_{50} >500 mg/L) en un tiempo de 24 h. El mecanismo de toxicidad de estas NPs fue el daño a la membrana celular, ocasionado por la carga superficial negativa, el menor tamaño hidrodinámico de las NPs de SnO_2 ES y las moléculas cargadas positivas sobre la membrana de la bacteria Gram positiva *B. subtilis*, este fue el mecanismo clave en la toxicidad de las NPs de SnO_2.

El desarrollo en varias áreas de estos nuevos nanomateriales es muy rápido y la exposición a estos, atrae la atención por el posible riesgo ambiental. La comprensión de los efectos ambientales es muy necesaria para poder diseñar materiales biocompatibles y amigables al medio ambiente. Por lo cual este tipo de evaluaciones de toxicidad en modelos biológicos ambientales, ayuda a determinar el posible efecto causado al medio ambiente.

ABSTRACT

The increase in the applications of nanoparticles in the industry, entails the release in the middle environment and therefore the interaction with the biological systems, causing a possible effect.

In the present study we evaluated the toxic effect of 5 nanoparticles (CuO, SnO_2, Fe° and Fe_3O_4) with applications in several areas. Toxicity was determined in biological models of environmental importance such as bacteria (Gram positive and negative) and yeasts. Prior to the toxicity assessment, nanoparticles (NPs) were characterized by various techniques; X-ray diffraction (XRD), scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM), the hydrodynamic size and potential Z. Cell viability was determined from an initial inoculum of $1x10^9$ CFU/mL exposed to the NPs for 24 h (100-1000 mg/L), as control, cells without exposure were used. The mechanisms of toxicity were defined by means of confocal microscopy, SEM and the quantification of soluble ion.

The characterization of NPs showed spherical forms (2-85 nm) and a flower-like (800 nm), as well as high purity. The hydrodynamic sizes in the different media were on average 149-1105 nm and the surface charge was negative in a range of -20 to -30 mV. Exposure to CuO NPs showed a toxic effect from the 600 mg/L concentration with a 2 h exposure time (IC_{50}> 400 mg/L) in Gram positive bacteria *B. subtilis*. The mechanism of toxicity of these NPs was the ionization of Cu^{2+} in the LB medium. The exposure to SnO_2 E2 NPs affected the viability of *B. subtilis* from a concentration of 500 mg/L (IC_{50}> 500 mg/L) in a time of 24 h. The toxicity mechanism of these NPs was cell membrane damage, caused by the negative surface charge, the smaller hydrodynamic size of SnO_2 ES NPs and the positive charged molecules on the membrane of Gram positive *B. subtilis*, this was the key mechanism in the toxicity of these SnO_2 NPs.

The development in several areas of these new nanomaterials is very fast and the exposure to these, attracts the attention by the possible environmental risk. Understanding of environmental effects is very necessary in order to design

biocompatible and environmentally friendly materials. Therefore, this type of toxicity assessment in environmental biological models helps to determine the possible effect caused to the environment.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento en las aplicaciones de las NPs (metálicas u óxidos de metal) incrementa las posibilidades de su liberación en el ambiente. En la toxicología tradicional para saber si un reactivo es tóxico, se toma en cuenta el tiempo y la concentración del reactivo, en el caso de la evaluación de la toxicidad de nanomateriales (NM), esto no es lo único aplicable, además de tomar en cuenta los factores anteriores, las características fisicoquímicas de la NP (tamaño, forma, composición, carga superficial) se relacionan con el efecto tóxico causado (Peralta-Videa et al., 2011).

En las evaluaciones de toxicidad se tomaron en cuenta diversos factores como; el tamaño menor de los NPs (10 nm de tamaño primario) presentaron un mayor efecto tóxico comparado con tamaños más grandes (Lin et al., 2014). Además se relacionó con la forma de la NP, la interacción entre la célula-NP (Laha, et al., 2014). Por ejemplo la forma de nanotubos y de tipo hoja, presentaron menor interacción con la célula por la alineación con esta, en cambio en la forma esférica presentó mayor toxicidad (Tong et al., 2013).

Otro factor importante en la evaluación de la toxicidad es el modelo biológico, se han realizado diversos estudios en modelos de células procariotas y eucariotas, como; células humanas, organismos acuáticos y microorganismos (Kahru & Dubourguier, 2010; Kumar, Pandey, Singh, Shanker, & Dhawan, 2011; Ray, Yu, & Fu, 2009). La utilización de esta variedad de modelos biológicos es por que presentan características celulares diferentes. En el caso de las células procariotas, por ejemplo las bacterias por su membrana celular se dividen en dos grupos: Gram negativas, donde la membrana celular está compuesta por varias capas de peptidoglicano y es bastante compleja, mientras que la membrana de las Gram positivas está formada por una capa delgada de peptidoglicano y ácidos teicoicos (Hajipour et al., 2012). Un modelo de célula eucariota utilizado comúnmente para estudios de toxicidad son las levaduras ya que éstas son de fácil manipulación (García-Saucedo, Field, Otero-Gonzalez, & Sierra-Álvarez, 2011)

La mayoría de los reportes de efecto tóxico de NPs inorgánicas estudiaron NPs de CuO, TiO_2, ZnO, Ag, las cuales presentaron efectos citotóxicos, como daño a la membrana y a la función celular, desencadenando una respuesta inflamatoria y estrés oxidativo (Dalai, Pakrashi, Kumar, Chandrasekaran, & Mukherjee, 2012; De Matteis et al., 2015; Maurer-Jones, Gunsolus, Murphy, & Haynes, 2013; Niska, Santos-Martinez, Radomski, & Inkielewicz-Stepniak, 2015). En base a estos estudios los mecanismos de toxicidad de las NPs inorgánicas descritos son; la disolución o solubilidad de las NPs, la formación de especies reactivas de oxigeno (ERO/ROS) y el daño a la membrana (Chang, Zhang, Xia, Zhang, & Xing, 2012; Suresh, Pelletier, & Doktycz, 2013; Thill et al., 2006)

Los ensayos y la descripción de los mecanismos de toxicidad de NPs en bacterias y levaduras como modelos biológicos tienen ciertas ventajas sobre los ensayos con células humanas, principalmente por lo sencillos y rápidos, además estos modelos se encuentran en el medio ambiente, por lo que su estudio puede dar una idea de los posibles efectos en los sistemas biológicos, lo que llevaría a obtener métodos más rápidos de análisis de toxicidad de NPs.

2. ANTECEDENTES

2.1. Nanotecnología

La nanotecnología diseña, caracteriza y aplica nuevos materiales en una escala nanométrica. A nivel mundial se ha presentado un auge en la utilización de estos nanomateriales (NMs), principalmente por países de primer mundo, como en Estados Unidos, que es el principal productor en el mercado de la nanotecnología a nivel mundial, seguido por los países de Europa, proyectándose como un área con extensa investigación y desarrollo.

2.2. Clasificación de los nanomateriales

Los nanomateriales son aquellos con una escala nanométrica, en un rango de 1-100 nm en al menos una de sus dimensiones. Se han descrito varias clasificaciones de los NMs en base a su origen, dimensiones (0D, 1D, 2D y 3D) y composición (Dolez, 2015). La clasificación de acuerdo a la composición se divide en NMs de origen orgánico e inorgánico (Fig 1) (Peralta-Videa et al., 2011).

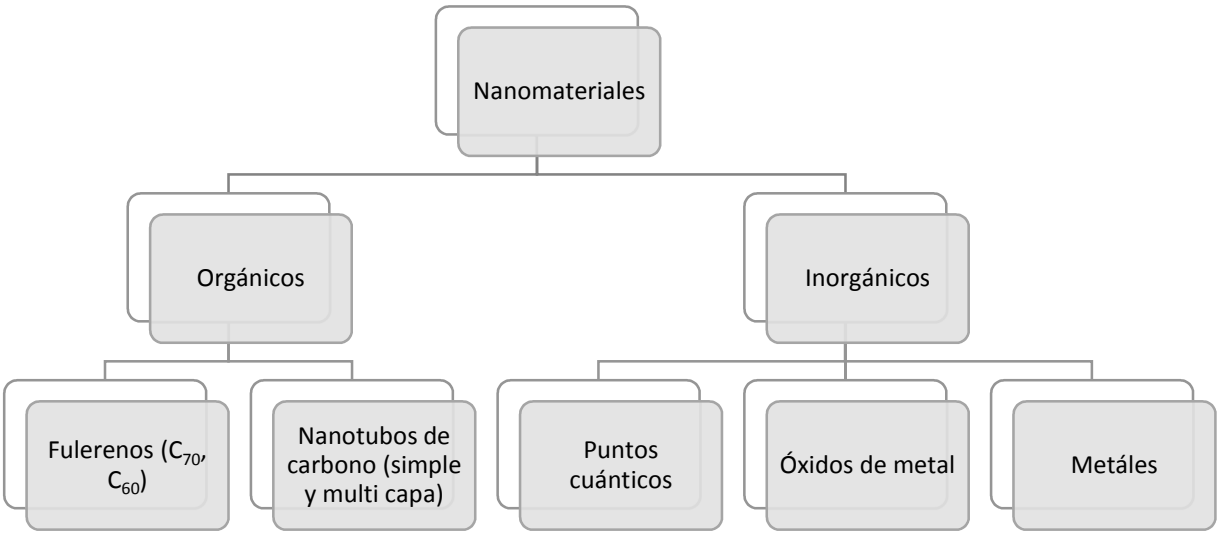


Fig 1 Clasificación de los nanomateriales de acuerdo a su composición (Peralta-Videa, et al., 2011)

Los dos tipos de NMs orgánicos e inorgánicos se caracterizan por tener propiedades y características diferentes (Dolez, 2015), en seguida se describe más a detalle cada uno de ellos.

2.2.1. Nanomateriales orgánicos

En la clasificación de los nanomateriales orgánicos se encuentran los fulerenos y los nanotubos de carbono. Los fulerenos son moléculas con 60 átomos de carbono, comúnmente llamados C_{60}, de diferente forma (esférica, elíptica y en forma de tubos), la estructura del C_{60} es una combinación de 12 anillos pentagonales, 20 anillos hexagonales, con una forma de esfera con 60 vértices de 60 carbonos (Fig 2). Los furelenos tienen aplicaciones en varias áreas como en la industria de la energía renovable en la fabricación de celdas solares y en la industria farmacéutica, han sido usados para controlar el daño neurológico producido por el Alzheimer, debido a que los fulerenos producen antioxidantes que evitan la oxidación de la célula (Thompson & Fréchet, 2007; Yadav & Kumar, 2008).

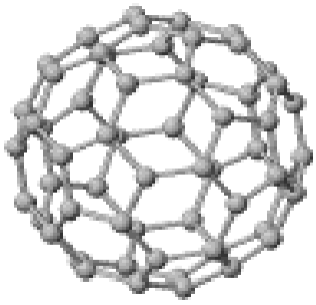


Fig 2 Estructura de fulereno C_{60} “Buckministerfullerene” (Yadav & Kumar, 2008)

Los nanotubos de carbono son NMs de origen orgánico los cuales se sintetizan de pared siempre o múltiple (Fig 3), en la estructura simple de los nanotubos, presentan una capa de grafeno enrollada en forma cilíndrica, con un diámetro de aproximadamente 1 nm y con varios micrómetros de longitud, mientras que los nanotubos con capa múltiple, contienen dos o más capas concéntricas con diferentes diámetros y longitudes (Ju-Nam & Lead, 2008). Son usados por sus propiedades y estructura en varios campos como; en la industria de textiles,

electromagnética, electroacústica, química, óptica, en el área de biomedicina particularmente en el de diagnóstico de enfermedades y como terapia contra el cáncer (Majumder, 2015; Sajid et al., 2016).

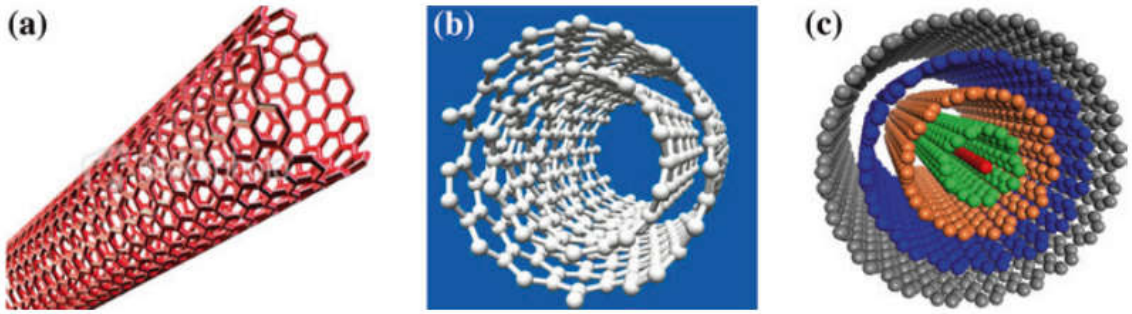


Fig 3 Estructuras de nanotubos de carbono de capa simple **(a)** doble **(b)** y multicapa **(c)** (Majumder, 2015)

2.2.2. Nanomateriales inorgánicos

En los NMs de origen inorgánico se encuentran los puntos cuánticos, los cuales son nanocristales que contienen de 1000 a 100,000 átomos y presentan efectos cuánticos como fluorescencia prolongada (Fig 4), con características ópticas y eléctricas únicas con aplicación en la industria biomédica (Ray et al., 2009).

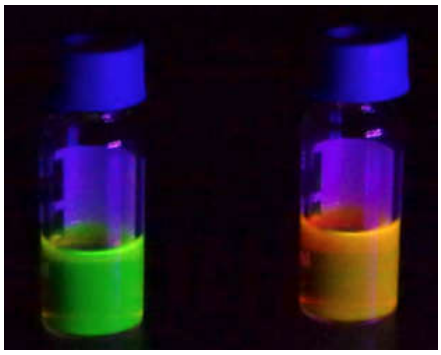


Fig 4 Solución de puntos cuánticos de CdSe bajo una lámpara de UV (Tian, Wang, Xu, & Luo, 2016).

2.3. Nanopartículas inorgánicas

Las nanopartículas son partículas microscópicas con una dimensión en el orden de 1-100 nm (Fig 5), la composición química es metal (Au, Ag, Fe^0) y de óxido de metal (ZnO_2, TiO_2) (Peralta-Videa et al., 2011; Ray et al., 2009). En la síntesis de NPs se han utilizado metodos como ultrasonido, tratamientos hidrotérmicos, precipitación alcalina, entre otros (A.S., S.J., B., & R.S., 2010; Gandhi et al., 2010; Hoa et al., 2010; Vásquez et al., 2016).

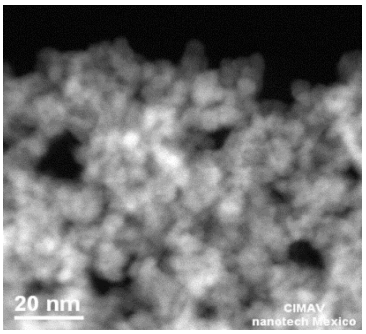
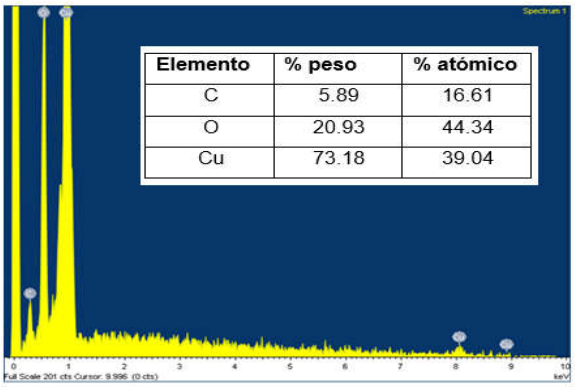


Fig 5 Imagen de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de CuO

La caracterización de las NPs se lleva a cabo por varias técnicas., como las microscopías electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET), donde se determina el tamaño primario y la forma de las NPs. Las dos microscopías tienen acoplado un detector de espectroscopia de energía dispersiva (EDS), el cual determina la composición elemental (Fig 6) de la muestra. (Harris, 2015; Suga et al., 2014).



Elemento	% peso	% atómico
C	5.89	16.61
O	20.93	44.34
Cu	73.18	39.04

Fig 6 Patrón de EDS y composición elemental de nanopartículas de CuO

La difracción de rayos X (DRX) es otra técnica muy utilizada en la caracterización de materiales, en esta se lleva a cabo una interacción entre la estructura de la muestra con la fuente de rayos X (Fig 7), identificando la fase cristalina y la pureza de la muestra (A.S. et al., 2010; Tirado-Guízar, Pina-Luis, & Paraguay-Delgado, 2015; Vásquez et al., 2016).

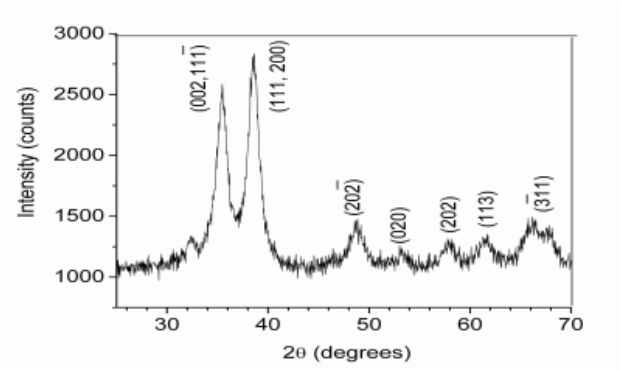


Fig 7 Espectro de difracción de rayos X de nanopartículas de CuO (A.S. et al., 2010).

La caracterización de las NPs en los medios acuosos es importante debido a que pueden sufrir transformaciones; químicas (fotodegradación, oxidación, solubilidad), físicas (agregación), biológicas e interacciones con macromoléculas (oxidación, solubilidad) y degradación causada por los componentes del medio (Lowry et al., 2012). En base a lo anterior es necesario la determinación del tamaño hidrodinámico y el potencial zeta o carga superficial de las NPs en los medios acuosos o biológicos.

El tamaño hidrodinámico de las NPs se basa en la dispersión dinámica de la luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés “Dynamic light scattering”), es una técnica físico-química que se usa para determinar la distribución del tamaño de las partículas en dispersión. Se basa en la dispersión de la luz láser, la cual alcanza numerosas partículas de la suspensión, la luz del láser separa en una dirección, los haces de luz dispersados por las distintas partículas que interfieren entre si y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Esto es debido al movimiento browniano, en donde las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, provocando interferencias y cambios en la intensidad de la dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también cambia la variación de la intensidad de dispersión, En cambio las partículas lentas (partículas grandes) provocan variaciones más lentas. Por lo general, en la dispersión de la luz dinámica la muestra permanece en reposo (Fig 8). El término dinámico no se refiere al movimiento de la muestra en sí, sino a la vibración de las partículas de la muestra. El equipo mide las fluctuaciones en la intensidad de dispersión con el tiempo para determinar el coeficiente de difusión translacional (D), y luego el radio hidrodinámico. Esta técnica es un método muy usado para comprender el crecimiento de cristales, la agregación o la nucleación de partículas (Minor, van der Linde, van Leeuwen, & Lyklema, 1997).

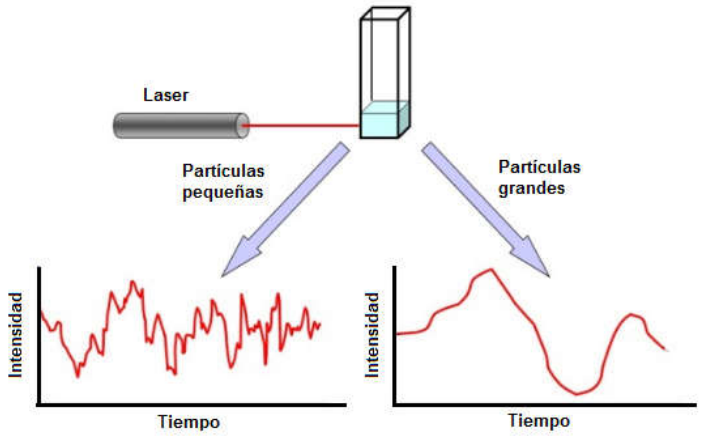


Fig 8 Distribución del tamaño de las partículas en dispersión

El potencial zeta o carga superficial, se mide usando la técnica de electroforesis en una célula capilar. La electroforesis se define como el efecto que produce un campo eléctrico sobre las partículas con una carga neta, migrando hacia el electrodo de carga opuesta. Las partículas submicronicas tienen muy poca inercia, la velocidad terminal es alcanzada en microsegundos. La velocidad actual es determinada por la carga asociada con la partícula (potencial Z), la viscosidad del medio y el campo aplicado. En una célula capilar que está cerrada por los extremos, el líquido retorna sobre la parte central. La movilidad real de la partícula, de la que se desprende el Potencial Z, es medida en la capa estacionaria (stationary layer), que corresponde al punto donde se cancela el movimiento del flujo del fluido a lo largo de las paredes de la célula (electro-osmosis) con el flujo de retorno por el centro. Esta capa debe ser localizada con precisión (Luxbacher, 2014).

La caracterización de las NPs inorgánicas, está relacionada con el tipo de aplicación en áreas como la industria, medicina, medio ambiente, entre otras. Algunas de las aplicaciones se describen a continuación.

2.4. Aplicaciones de nanopartículas inorgánicas

Las primeras aplicaciones de las NPs inorgánicas fueron en la fabricación de materiales como revestimientos, en la electrónica y la informática en chips de memoria y pantallas (Fig 9). Después se aplicaron en campos como la medicina en el diagnóstico de cáncer, transporte de grupos funcionales específicos tales como especies reactivas de diversos fármacos, aplicaciones industriales, manufactura, cuidado personal, ambiental (Hajipour et al., 2012; Marquis, Love, Braun, & Haynes, 2009; Schrand et al., 2010; Suresh et al., 2013). En particular las NPs de Ag, ZnO, TiO_2 son las que más se han utilizado en productos de pastas de dientes, productos de belleza, bloqueadores solares y textiles (Kahru & Dubourguier, 2010).

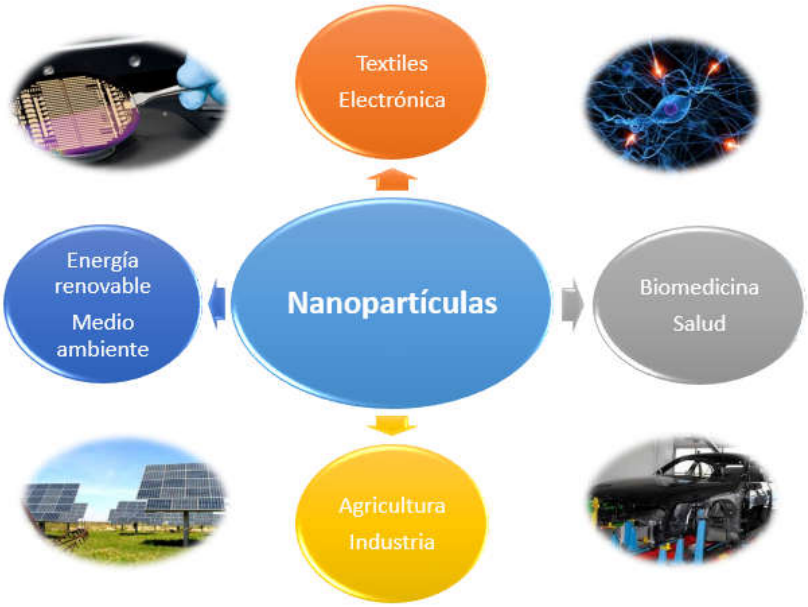


Fig 9 Aplicaciones de nanopartículas inorgánicas en diversas áreas

Actualmente las NPs de CuO, Fe°, SnO_2 y Fe_3O_4 tienen una amplia variedad de aplicaciones por sus características y propiedades físicas, algunas de ellas se describen a continuación (Jiang, Yang, Vachet, & Xing, 2010; Jin et al., 2015; Zhang et al., 2014).

2.4.1. Nanopartículas de óxido de cobre.

Las NPs de óxido de cobre (CuO) por las características de metal semiconductor presentan una brecha energética estrecha (1,2 eV), el tamaño nano le confiere gran área superficial y esto potencializa sus propiedades físicas y químicas (Anandan & Yang, 2007). Actualmente, tienen varias áreas de aplicación como se describe la revisión de Zhang (2014) , en donde el tipo de síntesis y características de las NPs se asoció con las aplicaciones en áreas como; materiales energéticos, biosensores, celdas solares, baterías y remoción de contaminantes orgánicos en aguas residuales (Fig 10).

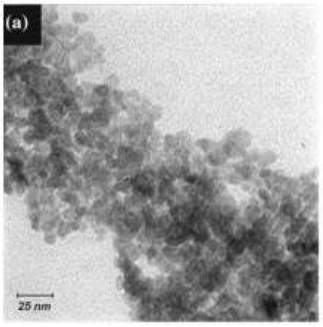


Fig 10 Imagen de microscopia electrónica de transmisión de nanopartículas de CuO (Rahnama & Gharagozlou, 2012)

2.4.2. Nanopartículas de óxido de estaño

La forma y tamaño de las NPs de SnO_2 se vinculó a las propiedades electrónicas, ópticas y con efectos catalíticos (Bhattacharjee, Ahmaruzzaman, & Sinha, 2015; Jin et al., 2015) y en consecuencia esto se relacionó con el tipo de aplicación, por ejemplo las NPs esféricas pequeñas (10 nm) con una estructura macroporosa se mejoró la eficiencia en la base del colorante de las celdas solares (K.-N. Li et al., 2013). También se relacionaron con NPs de menor tamaño (4-6 nm) tienen un mayor efecto fotocatalítico en contaminantes orgánicos (Bhattacharjee et al., 2015). De acuerdo a la forma, las NPs tipo flor (1,5 µm de diámetro) y nanofibras (80-400 nm de diámetro) mostraron tener mayor sensibilidad a los gases (Ab Kadir et al., 2014; Jin et al., 2015). Con toda esta variedad de aplicaciones se siguió su estudio y determinaron que las propiedades fotocatalíticas y eléctricas, se pudieron potencializar estas características cuando se adicionó un metal (Zn, Cu, Fe) en pequeñas cantidades (5-10%) (Mishra & Sahay, 2012; Tirado-Guízar et al., 2015), y a este tipo de NPs se les llamó nanopartículas dopadas (Fig 11).

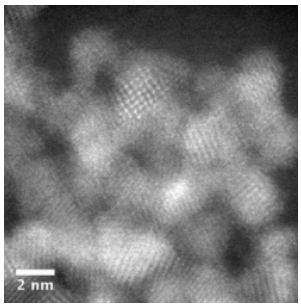


Fig 11 Imagen de microscopía electrónica de transmisión de NPs de SnO_2- Fe (Tirado et al., 2010)

2.4.3. Nanopartículas de Hierro elemental y Magnetita.

Las NPs de Fe° y Fe_3O_4 (Fig 12) por sus propiedades eléctricas, ópticas, catalíticas y magnéticas, se han usado en la remediación del ambiente, debido a que son capaces de degradar contaminantes (Jang, Lim, & Hwang, 2014; L., F., M, & D., 2013). De igual forma, han tenido aplicación en el área de biomedicina, por sus propiedades magnéticas (Azcona, Zysler, & Lassalle, 2016).

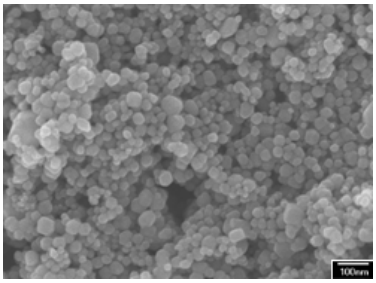


Fig 12 Imagen de microscopía electrónica de barrido de NPs de Fe_3O_4

En general las NPs tienen gran variedad de aplicaciones en el medio ambiente, como se mencionó; en la producción de celdas solares, pigmentos, sensores químicos de gases contaminantes, catalizadores ambientales, en la remediación del medio ambiente y esto puede ocasionar la interacción con los sistemas biológicos. En varios estudios en muestras ambientales como suelo, sedimentos (estuarios), aguas residuales, se ha observado esta interacción. Por ejemplo en el trabajo de Antizar-Lidislao (2015) determinó el efecto de las NPs de Ag en sedimentos de

estuarios, no observando un cambio significativo en las comunidades microbianas; sin embargo, se determinó que microorganismos de importancia en ciclos biogeoquímicos, si fueron sensibles a la presencia de las NPs de Ag. En muestras de suelo y aguas residuales se presentaron cambios en la composición de las comunidades microbianas por la presencia de NPs de ZnO, CeO_2, Fe_3O_4, SnO_2, TiO_2, (Chaúque, Zvimba, Ngila, & Musee, 2014; Ge, Schimel, & Holden, 2011; Vittori Antisari, Carbone, Gatti, Vianello, & Nannipieri, 2013), este tipo de estudios demostraron la importancia de la evaluación de la toxicidad de las NPs inorgánicas en el medio ambiente.

2.5. Toxicidad de nanomateriales.

La Nanotoxicología, caracteriza y cataloga los efectos tóxicos causados por los NMs (Marquis et al., 2009). Esta ciencia pretende entender, predecir y prevenir los riesgos que presentarían la utilización de estos nuevos materiales. Varios estudios determinaron la toxicidad de las nanopartículas de óxido de metal, como ZnO y TiO_2 (Jesuvathy Sornalatha et al., 2015; Li et al., 2014; Lin et al., 2014; Tong et al., 2013).

En los estudios de evaluación de la toxicidad de las NPs se investigó el impacto de diferentes NPs metálicas y de óxidos de metal, en cepas de bacterias y levaduras o en sistemas microbianos. Se han expuesto a diferentes concentraciones de NPs, tomando en cuenta diferentes condiciones de exposición como la iluminación, exposición en sólido o en líquido, así como condiciones de pH, composición de los medios biológicos usados. En la tabla 1 se presenta un resumen de algunos estudios de toxicidad en donde se determinó el posible mecanismo de toxicidad relacionado con las características de las NPs y de los modelos biológicos evaluados.

Tabla 1 Estudios de nanotoxicidad en microorganismos

Nanopar-tícula	**Caracterís-ticas**	**Concen tración**	**Modelo biológico**	**Aportación**	**Referencia**
Fe°	Esféricas 59.7+/-0.4 nm (TH)	0-120 mg/L	*E. coli* *S. cerevisiae*	Absorción de NPs	Schwegmann, et al., 2010
TiO_2-Cu y TiO_2	Esféricas 20 nm	0-100 mg/L	*M. smegmatis* *S. oneidensis*	Ionización del metal dopante (Cu^{2+})	W u, et al., 2010
HfO_2, SiO_2, Al_2O_3,CeO_2	Esféricas 10-100 nm	0-1000 mg/L	*S. cerevisiae*	Daño a la membrana celular	García-Saucedo, et al., 2011
CuO, NiO, ZnO, Sb_2O_3	Esféricas 10-210 nm	0-350 mg/L	*E. coli, B. subtilis, S. aureus*	La toxicidad se relacionó con las propiedades tóxicas intrínsecas de los metales que componen las NPs	Baek, et al., 2011
Fe°	Esféricas <50 nm	34000 mg/kg	Comunidad microbiana	Cambios en la estructura y composición de las células	Fajardo, et al., 2012
TiO_2	Nanotubos, barras y laminas	2.5-100 mg/L	*E. coli, A. hydrophila*	La forma de las NPs y las características	Tong, *et al.*, 2013

				del modelos biológico, determinan el tipo de interacción	
TiO_2	10-50 nm	10-500 mg/L	*E. coli*	El tamaño de partícula y la composición del medio biológico intervienen en el efecto tóxico	Lin, et al., 2014
ZnO	Formas: Flor, coliflor, semiesféricas 40-70 nm	250, 500, 750 y 1000 g/mL	Bacterias: Gram positiva (*S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli, E. aerogenes*)	Forma de la NP Características de modelos biológicos	Jesuvathy Sornalatha, et al, 2015
CuO	Forma: Hoja, esféricas	0–0.4 mg/ml	Bacterias Gram positivas (*B. subtilis, M. luteous*) y Gram	La forma esférica causo mayor efecto en las bacterias Gram negativas y la forma hoja	Laha, et al., 2014,

			negativas (*E. coli y P. vulgaris)*	mayor toxicidad en las Gram positivas	
SnO_2	Esféricas de 2.1-4.1 nm	25-100 mg/L	*E. coli*	Inhibición del crecimiento celular y proponen el mecanismo de daño a la membrana	Vidhu and Philip, 2015

En base a los estudios realizados el tamaño, composición y la forma de NPs se han descrito como los factores clave que influyen en la toxicidad (Karlsson et al., 2009; Suresh et al., 2013).

2.5.1. Factores de toxicidad de las NPs inorgánicas

Existen diversos factores que influyen en la toxicidad de las NPs (Fig 13), un menor tamaño de NP provocó mayor toxicidad (Lin et al., 2014), otro factor es la forma de la NP, se relacionó con la interacción con la célula (Tong et al., 2013). Además, se ha observado que la solubilidad de las NPs (ZnO y CuO), ocasionaron un efecto toxico por el ion y no por la NP (Chang et al., 2012).

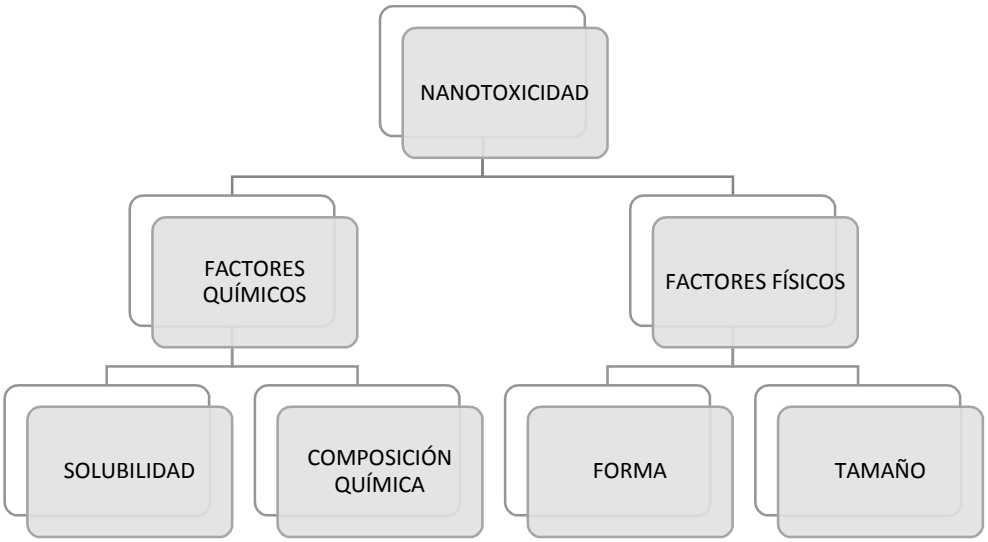


Fig 13 Factores que influyen en la toxicidad de las nanopartículas.

Los mecanismos de toxicidad entre las NPs en los sistemas biológicos aún no son claros totalmente y esto es por los diferentes factores de toxicidad que se deben de tomar en cuenta, como se describió anteriormente (Chang et al., 2012; Ray et al., 2009).

2.6. Mecanismos de toxicidad.

Los mecanismos de toxicidad pueden cambiar de una NP a otra, por la capacidad de unión e interacción con los componentes en los sistemas biológicos (materia biológica, proteínas, etc.) (Ray et al., 2009). En la Fig 14 se presentan los mecanismos de toxicidad de las NPs inorgánicas, siendo los más relevantes la disolución de las NPs, la formación de especies reactivas de oxigeno (ERO/ROS) y el daño a la membrana. Las características principales de los mecanismos de toxicidad se describen en los siguientes puntos.

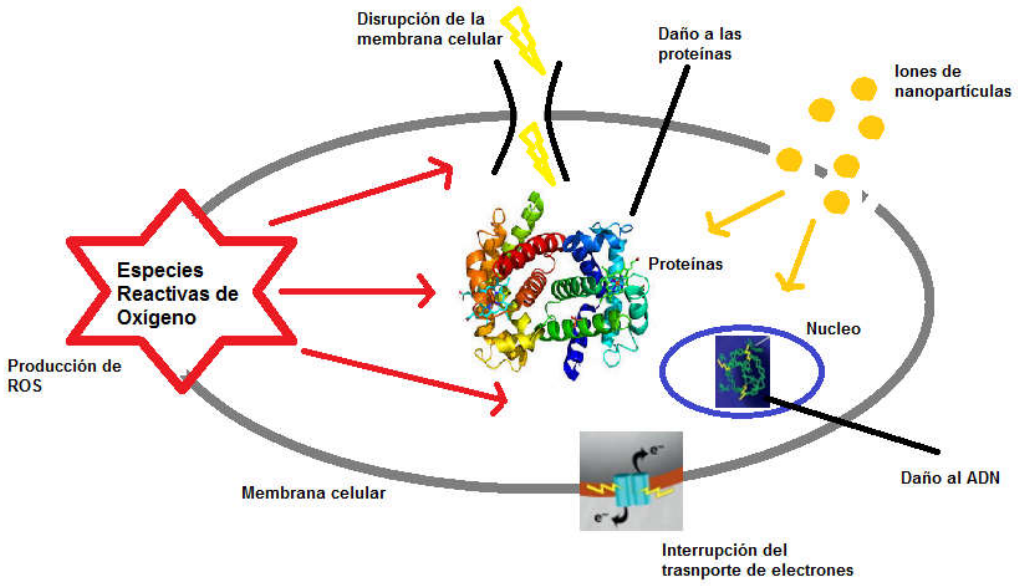


Fig 14 Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas en bacterias

2.6.1. Disolución de iones.

Un factor importante de la toxicidad de las NPs, es la composición química de las NPs. Algunos metales se pueden disolverse muy fácilmente en medios biológicos, y esto ocasiona el efecto toxico, es decir, la toxicidad es ocasionada por la ionización de las NPs. En este caso, la toxicidad se presentó porque el ion puedo penetrar a la célula por su carga, interaccionando con los componentes de le membrana celular, como por ejemplo los extremos carboxilo, amino e hidroxilo de proteínas y carbohidratos, causando un daño a los organelos y a las funciones metabólicas principales de la célula, teniendo como consecuencia la muerte celular (Chang et al., 2012; Suresh et al., 2013).

2.6.2. Daño a la membrana

Las características de los modelos biológicos estudiados, presentaron diferencias en la composición de las membranas celulares, la cual está diseñada para proveer fuerza, rigidez, forma y proteger de daños mecánicos y cambios osmóticos a la

célula. La interacción de las NPs con la membrana de la célula se lleva a cabo por medio de interacciones electrostáticas y la disrupción de la integridad de la membrana (Thill et al., 2006). El modelo por ejemplo *E. coli* es menos susceptible que *B. subtilis* y *S. aureus* a las NPs de CuO y la diferencia entre estos microorganismos es la composición de la membrana celular de cada uno (Baek & An, 2011).

2.6.3. Producción de especies reactivas de oxígeno.

En la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocaron daño en la estabilidad de las membranas ya sea directamente provocando un daño físico o indirectamente provocando oxidación, produciendo la muerte celular. También se ha observado que las NPs que tuvieron la capacidad de entrar a la célula pudieron ocasionar genotoxicidad (Chang et al., 2012). En general, la toxicidad de los NPs con base de metal presentaron la liberación de iones metálicos tóxicos y la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) como los principales mecanismos de acción (Li et al., 2014; Lin et al., 2014; Suresh et al., 2013). Por otra parte la activación de procesos fotocatalíticos, adsorción en la superficie de la célula y el daño de la membrana de célula causado por las NPs, son también otros mecanismos de toxicidad importante, que podrían actuar solos o en combinación con todos los demás (Suresh et al., 2013).

Los mecanismos de toxicidad hasta ahora descritos, en la evaluación de la toxicidad de NPs, dependieron del tipo de modelo biológico utilizado, por ejemplo en plantas (De Matteis et al., 2015; Maurer-Jones et al., 2013), modelos acuáticos (Val*e et al., 2016)*, células de mamíferos (De Matteis et al., 2015; Niska et al., 2015), bacterias (Tong et al., 2013) y levaduras (García-Saucedo et al., 2011) .

2.7. Modelos biológicos ambientales

Los modelos biológicos ambientales son células procariotas (bacterias) y células eucariotas (levaduras). Entre los microorganismos modelo más empleados para la experimentación son las bacterias (Gram positivas y Gram negativas), estudiadas y

descritas a nivel de genoma, en las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, que es muy utilizada por su ciclo de vida por ser muy similar a las células humanas (Karathia, Vilaprinyo, Sorribas, & Alves, 2011; Wei, Liu, Dubchak, Shon, & Park, 2002).

2.7.1. Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Las bacterias se dividen en dos grupos: Gram positivas y las Gram negativas. La diferencia entre una bacteria y otra es la membrana celular (Fig 15). La membrana celular de la bacteria Gram positiva está compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano (PG), los ácidos teicoicos, son conectados e incrustados en la capa de PG y los ácidos lipoteicoicos se extienden hasta la membrana citoplasmática (Fig 15a). La membrana celular de la bacteriana Gram negativa se compone de una membrana exterior fina de lipoproteínas y una capa de PG, situado dentro del periplasma que se forma entre las membranas externas e internas. La membrana externa incluye moléculas de porinas y lipopolisacáridos (Fig 15b) (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2005).

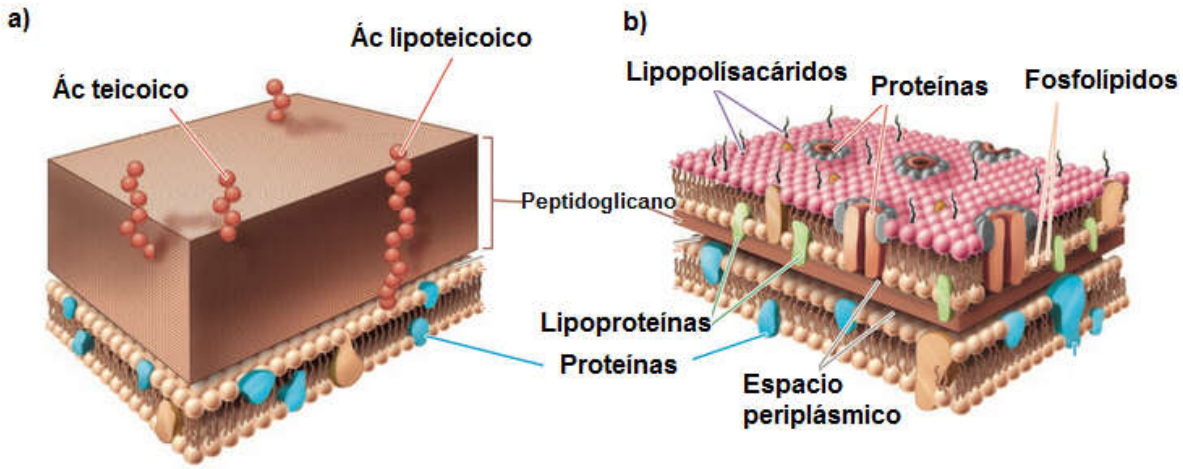


Fig 15 Estructura de la membrana celular de las bacterias **(a)** Gram positiva y **(b)** Gram negativa.

La bacteria Gram negativa *Pseudomona aeruginosa* tiene una morfología microscópica de bacilo recto, su metabolismo es aerobio y tienen requerimientos

nutritivos simples, con una temperatura de crecimiento entre los 15 y 37°C y en pH neutro. Las *Pseudomonas* son ecológicamente muy significativas en el suelo, agua y responsables de la degradación de compuestos solubles. Son bacterias oportunistas en el ser humano, es decir, pueden provocar una infección cuando el individuo está bajo de defensas inmunológicas. Otro modelo de bacteria Gram negativa es *Escherichia coli* que presenta una forma de bacilo no esporulado, es aerobia facultativa, con requerimientos nutritivos simples, fermentadora de glucosa. Son patógenas para el hombre, animales y plantas. En el género *Escherichia* es habitante universal de todos los animales de sangre caliente, teniendo como función nutricional sintetizar vitaminas y como marcador contaminación de agua potables (Fig 16) (Madigan et al., 2004).

Fig 16 Imagen de microscopia óptica de la bacteria Gram negativa *E. coli*

En las bacterias Gram positivas se encuentra *B. subtilis*, con una morfología de bacilo, aerobio facultativo, no tiene requerimientos altos de nutrición, produce esporas, no es patógeno para el ser humano y tiene la capacidad de producir enzimas extracelulares como hidrolasas, las cuales rompen polisacáridos complejos, ácidos nucleicos o ácidos grasos hasta unidades asimilables por las células y estos productos sirven como fuente de energía para los organismos que estén a su alrededor por ejemplo si están en el suelo las plantas. El género *Staphylococcus* es aerobio, presenta una forma microscópica de coco, son relativamente tolerantes a medios con bajas concentraciones de agua, por lo cual resisten a medios secos y salinos. Se encuentran comúnmente de los seres humanos y animales provocando enfermedades en la piel o en vías respiratorias (Fig. 17) (Madigan et al., 2004).

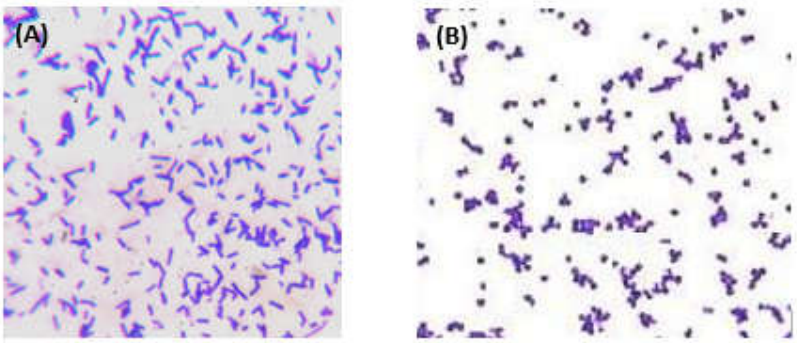


Fig 17 Imagen de microscopia óptica de las bacterias Gram positivas *B. subtilis* **(A)** y *S. aureus* **(B)**.

2.7.2. Levaduras

La pared celular de las levaduras se encuentra constituida principalmente por polisacáridos en proporción de 58% en β-glucanos, 40% en manoproteínas y un 2% de quitina. Las levaduras se encuentran principalmente en lugares ricos en azucares como frutos, flores y cortezas de árboles (Fig 18) (Madigan et al., 2004).

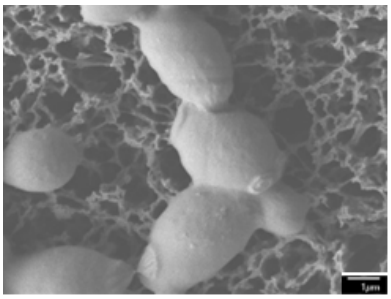


Fig 18 Imagen de microscopia electrónica de barrido de la levadura *S. cerevisiae*

Las levaduras presentan una forma oval, esférica o casi cilíndrica y la división celular es casi siempre asimétrica por gemación. Las células de las levaduras son mucho más grandes que las bacterias. La levadura *C. albicans* es un patógeno oportunista en el ser humano, mientras que la levadura *S. cerevisiae* es utilizada en la industria de la fermentación de pan, cerveza y vino (Madigan et al., 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de NPs en aplicaciones industriales, se ha incrementado en los últimos años, su posible liberación en el medio ambiente, esto podría provocar efectos tóxicos en sistemas biológicos.

Las NPs de CuO, SnO_2, Fe° y Fe_3O_4, actualmente tienen una gran variedad de aplicaciones en el área medio ambiental. Por lo cual, la evaluación de la citotoxicidad de estas NPs en microorganismos, ayudará a conocer su posible efecto tóxico en el medio ambiente.

4. HIPÓTESIS

La toxicidad de las NPs en modelos ambientales dependerá de las características fisicoquímicas (composición, forma y tamaño), así como el tipo de microorganismo expuesto.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto tóxico y los mecanismos de toxicidad de nanopartículas emergentes (SnO_2, CuO, Fe^0, Fe_3O_4), utilizando como modelo microorganismos relevantes en el medio ambiente.

5.2. Objetivos Particulares

1. Sintetizar y caracterizar las NPs de estudio.
2. Determinar la toxicidad de NPs inorgánicas en microorganismos modelo (bacterias y levaduras).
3. Relacionar el efecto del tamaño, composición y forma de las NPs con la toxicidad.
4. Establecer los mecanismos de toxicidad de las NPs que presenten un efecto tóxico.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Nanopartículas inorgánicas.

Debido a las aplicaciones en diversas áreas, las NPs inorgánicas evaluadas fueron las NPs de CuO, NPs de SnO_2 dopadas (Fe, Zn y Ti) y SnO_2 sin dopar con dos formas tipo flor y esféricas (dos tamaños primarios de NPs), las cuales fueron sintetizadas en el centro de investigación, y las NPs comerciales de Fe° y Fe_3O_4 (Nanoiron, Sigma Aldrich).

6.1.1. Síntesis de nanopartículas de Óxido de cobre

La síntesis de NPs de óxido de cobre (CuO) se llevó a cabo por el método de precipitación descrito por Lange (2010). Los reactivos usados fueron de grado analítico. Se preparó una solución de acetato de cobre ($Cu(CH_3COO)_2$) 0.02 M en 300 mL de agua destilada, se le añadió 1 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH). Se calentó la solución a 100 °C con agitación constante y se le añadió 0.4 g de hidróxido de sodio (NaOH, pH de 6-7). La solución se dejó en agitación constante durante 30 min, a 100 °C. Después de este tiempo, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las NPs se recuperaron por medio de centrifugación a 12,500 rpm durante 30 min y se realizaron dos lavados con 15 mL de agua destilada en las anteriores condiciones de centrifugación. Al terminar los lavados las NPs se resuspendieron en 5 mL de agua destilada. Las NPs se colocaron en un vidrio de reloj, para dejar secar a temperatura ambiente (24 a 48 h). Se recuperaron las NPs en polvo.

6.1.2. Síntesis de nanopartículas de Oxido de estaño.

Las NPs de óxido de estaño (SnO_2) con diferente morfología (esféricas y tipo flor) se sintetizaron por medio de tratamiento hidrotérmico (Vásquez et al., 2016). El precursor de la síntesis fue la sal de Cloruro de estaño pentahidratado ($SnCl_4.5H_2O$), de la cual se adicionaron 0.5 g y se mezcló con 0,18 g o 0,54 g de NaOH (para NPs esféricas de menor tamaño o flor, respectivamente) en 15 mL de agua tri-destilada con agitación constante. Se agregó 15 mL de etanol (C_2H_6O) gota a gota y la

solución resultante se transfirió a un vaso de teflón de 40 mL (reactivos grado analítico). El vaso se colocó dentro de una autoclave de acero inoxidable a 200 °C durante 48 h, la solución se enfrió a temperatura ambiente. Las NPs fueron recuperadas por centrifugación y se realizaron tres lavados con agua tri-destilada. Al final, las NPs se secaron en el horno a 80 °C por 12 h.

La síntesis de NPs de SnO_2 esféricas de mayor tamaño se llevó a cabo a través de un método de calcinación usando como precursor la sal de $SnCl_4.5H_2O$. Se pesaron de 1-2 g en un crisol, el cual se llevó a un horno a 350 °C durante 1 h, las NPs se recuperaron en polvo.

Las NPs de SnO_2 dopadas se sintetizaron de acuerdo a lo descrito por Tirado (2015). Se prepararon tres soluciones (reactivos de grado analítico): Solución A de $SnCl_4 \cdot 5H_2O$ (98%) 2 mmol en 10 mL de agua destilada, la solución B de urea 40 mmol en 15 ml de agua desionizada y solución C que contenía el metal dopante 0.2 mmol (Acetato de zinc pentahidratado ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 5H_2O$), Nitrato de fierro nonahidratado ($Fe\ (NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) y Titanio oxalacetil acetona ($TiO\ (acac)_2$ 90%). en 10 mL de agua desionizada. Las soluciones A y C preparadas se mezclaron y se agitaron durante 10 min, después de este tiempo se agregó la solución B. La solución final se colocó en una autoclave de teflón a 90 °C) durante 6 h. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente, para después recuperar las NPs por medio de centrifugación, se realizaron cuatro lavados con agua desionizada y al final dos lavados con etanol absoluto. Las NPs se secaron toda la noche a 50°C

6.1.3. Nanopartículas de Fierro y Magnetita

Las NPs de hierro elemental (Fe°) fueron adquiridas en la empresa NANOIRON, la cual se encargó de la síntesis y producción de NPs de Fe° (nZVI), la empresa desarrolló las aplicaciones en el área ambiental, en la estabilización y control de contaminantes de aguas. En el caso de las NPs de magnetita (Fe_3O_4), fueron adquiridas en la empresa SIGMA-ALDRICH (No. de catálogo 637106), las cuales han tendido aplicación como materiales magnéticos y en la biomedicina.

6.2. Dispersiones madre (stock) de nanopartículas.

La preparación de dispersiones madre se realizaron con los objetivos de dosificar y caracterizar adecuadamente las concentraciones de las NPs en los diferentes ensayos, evitando posibles errores al momento de pesar. Las dispersiones stock fueron de 5000 mg/L de NPs en buffer de fosfato 5 mM pH 7, antes de ser usadas se sonicaron durante 15 min a 500 W con un sonicador de baño (Agua onda 9381 Barnstead Lab Line) para ayudar a reducir la aglomeración de las NPs.

6.3. Caracterización de nanopartículas.

La determinación del tamaño primario y forma de las NPs se realizó por medio de las microscopías electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET). La determinación de la composición elemental se determinó por la técnica de espectroscopia de energía dispersiva (EDS), la fase cristalina se obtuvo por medio de difracción de rayos X. La caracterización de la estabilidad de las dispersiones de las NPs se realizó por mediante la determinación del tamaño hidrodinámico y potencial zeta o carga superficial en cada uno de los medios acuosos

El análisis de la fase cristalina de las NPs se realizó en el difractometro X´PertPRO PANalytical de Anton Paar. En el difractograma que se obtuvo se comparó las posiciones de los picos en la biblioteca digital del software PANalytical X'Pert HighScore Plus, identificando el compuesto de la muestra analizada.

La caracterización por medio de microscopía electrónica de barrido y de transmisión se realizó en el equipo JSM-7401F de Jeol y JEM-2200FS de Jeol, respectivamente. Se preparó una dispersión de NPs (polvo) que se resuspendió (50 mg) en agua destilada o etanol (1 mL) en un tubo eppendorf y para obtener una dispersión homogénea, se sonicaron durante 15 min a 500 W con un sonicador de baño (Agua onda 9381 Barnstead Lab Line). Esta dispersión se usó en la preparación de las muestras de MET y MEB. En el caso de MEB, Se colocó 5 µL de esta dispersión en un soporte de aluminio dejándose secar en condiciones ambientales para evaporar el solvente (agua o etanol); posteriormente, se observó en MEB con el detector de

electrones secundarios en el caso de las NPs de CuO, SnO_2, Fe° y Fe_3O_4. En la preparación de la muestra para MET, se tomó 5 µL de la dispersión de NPs (sonicada y homogenizada), se colocaron en una rejilla de cobre o níquel, y se dejó evaporar el solvente en condiciones ambientales. Se realizó un pretratamiento a la muestra antes de ser observada por MET, en el equipo de Plasma cleaner (Fischione Model 1020) durante 10 min con una mezcla de gases de 25% O_2 y 75% de Ar, para asegurar que la muestra no estuviera contaminada con materia orgánica. Las imágenes se tomaron con el detector de campo claro (NPs de CuO, SnO_2). La determinación de la composición elemental de las NPs se realizó en las dos microscopías por medio de detección de la energía dispersiva espectroscopia (EDS).

La caracterización de las NPs en los medios biológicos usados en los ensayos de toxicidad (Solución salina al 0.8%, el medio LB y YPD 0.1X), se realizó en el equipo Zetasizer Nano-ZS de Malvern Instruments. Donde se determinó el tamaño hidrodinámico y el potencial zeta. La determinación del tamaño hidrodinámico en el equipo se basa en la dispersión de la luz dinámica, mientras que el potencial zeta o carga superficial en la determinación de la carga por medio de electroforesis Doppler, donde se mide el movimiento de las partículas cargadas bajo un campo eléctrico. Las dispersiones de las NPs se prepararon como se menciona en el protocolo de dispersiones madre, se tomó muestra de ésta dispersión para obtener una concentración final de 250 mg/L y los medios diluidos (0.1X), con un volumen final de 8 mL en los diferentes medios biológicos. Se homogenizó la muestra y se dejó reposar durante 2 h, para después realizar la determinación correspondiente en el equipo.

En la determinación del tamaño hidrodinámico se usaron los siguientes índices de difracción: NPs de Fe_3O_4 de 2.42, CuO de 2.63, Fe° de 2.86 y SnO_2 de 1.997 (los valores de difracción son en el solvente agua).

6.4. Evaluación de toxicidad de nanopartículas.

6.4.1. Preparación de los microorganismos para la exposición a las nanopartículas.

Los microrganismos se activaron por medio de un preinoculo a 37 °C con agitación constante (200 rpm) durante 12 h con el objetivo de alcanzar la fase exponencial de crecimiento las bacterias y levaduras. Las células obtenidas se recuperaron y se lavaron dos veces con 10 mL de buffer de fosfatos 10 mM pH 7 a 10,000 rpm (10 min), y se resuspendieron en 10 mL de buffer de fosfatos 10 mM pH 7 para ser usadas como inóculo inicial de $1x10^9$ unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

6.4.2. Ensayos de exposición a las nanopartículas.

La exposición a las NPs se realizó en tubos de 50 mL con un volumen final de 5 mL en los diferentes medios biológicos: LB (0.1X) y NaCl 0.8% para bacterias y para levaduras YPD (0.1X), con un inoculo inicial de $1x10^9$ UFC/mL. Las concentraciones de las NPs fueron en el rango de 100 a 1000 mg/L. Se colocaron por triplicado células sin exposición a NPs y por duplicado cada una de las concentraciones de NPs que se evaluron. Todos los tratamientos fueron incubados a 37°C y 200 rpm por 24 h. En este tiempo de exposición se tomaron muestras en diferentes tiempos (0, 2, 8 y 24 h). La viabilidad celular se midió en porcentaje por el conteo de células (técnica de Milles-Misra) con la determinación de la relación del número de células expuestas a NPs (UFC/mL) entre el número de células sin exposición a NP (Ec. 1)

$$Viabilidad\ celular = \frac{\text{Número de células expuestas a NPs}}{\text{Número de células sin exposición a NPs}} * 100 \quad \text{Ec.1}$$

6.4.3. Técnica de conteo de micro gota (Milles-Misra).

En el conteo se tomó muestra de células con y sin exposición a NPs (0, 2, 8 y 24 h), con el objetivo de determinar el número de células viables. En el primer paso de la técnica se realizaron ocho diluciones seriadas para cada una de las células con y sin exposición a las NPs. Se tomaron 10 µL de cada dilución y se colocaron en el

agar biológico correspondiente para cada uno de los microrganismo (por duplicado). Se dejaron secar las gotas en los agares y se incubaron 24 h a 37 °C. Se realizó el conteo de colonias, tomando en cuenta el factor de la dilución, obteniendo al final el conteo de células en UFC/mL.

6.4.4. Ionización de nanopartículas

En estudios previos se presentó en los medios ricos en proteínas (LB, YPD) las NPs de CuO solubilizan más a comparación de medios isotónicos (NaCl). La liberación de iones se determinó en las dispersiones con efecto tóxico. En base a esto se determinó la ionización del Cu^{2+} de las NPs de CuO en el medio LB (0.1X), las concentraciones que se usaron fueron de 100, 400 y 600 mg/L. En la solución salina (NaCl 0.8%) y en el medio YPD (0.1X) se realizaron dispersiones en las concentraciones de 100 y 600 mg/L. En los tres medios biológicos se tomaron muestras para la cuantificación en los tiempos 0, 2 y 24 h de incubación a 37 °C a 200 rpm y las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 1 h. Se cuantificó el sobrenadante por medio de absorción atómica con el equipo GBC Avanta Sigma con una longitud de onda de 324,7 nm.

La determinación de la ionización del Sn^{4+} se llevó a cabo en las concentraciones de 0-1000 mg/L, las cuales se prepararon en medio LB (0.1X), se incubaron a 37 °C con agitación constante de 200 rpm y se tomaron muestras a las 0, 8 y 24 h de incubación de la dispersión y las muestras se centrifugaron a 12,400 g por 30 min. El Sn, Ti, Zn y Fe solubles se midieron del sobrenadante en el equipo de plasma de acoplamiento inductivo acoplado a un espectrofotómetro de emisión óptica (ICP-OES iCAP 6500, Thermo Scientific). La longitud de onda usada para la determinación en el caso del Sn fue de 242.949 nm, Ti de 336.121 nn, Fe de 259.94 y Zn de 213,856 nm.

6.4.5. Estabilidad de dispersiones de NPs de SnO_2.

La estabilidad de las dispersiones de las NPs de SnO_2 se determinó con la cuantificación la cantidad de Sn^{4+} en la fracción dispersa de la muestra mediante

ICP-OES (iCAP 6500, Thermo Scientific) en una longitud de onda de 242.949 nm. Se prepararon dispersiones de las diferentes NPs de SnO_2 (250 mg/L) en medio LB (0.1 X), se sonicaron y se incubaron a 37 °C en agitación constante a 200 rpm. Se tomaron muestras (1 mL) de la fracción dispersa al tiempo 0 y 2 h de incubación. La muestra de la fracción dispersa se preparó para su cuantificación por medio de una digestión ácida en el microondas Multiwave 3000, Anton Paar. Se colocó 1 mL de la muestra en los vasos de digestión con una mezcla de 8 mL de 37% HCl y 4 mL de HF de 48%. Las digestiones se llevaron a cabo en 800 W, presión máxima de 20 bares, 15 min de tiempo de rampa y a 30 min de tiempo de espera a 150 °C. Las muestras se analizaron en el equipo ICP-OES iCAP 6500, Thermo Scientific, la longitud de onda usada para la determinación en el caso del Sn fue de 242.949 nm, el resultado obtenido se analizó estereométricamente para obtener la concentración de SnO_2 disperso.

6.4.6. Toxicidad de Sn^{4+} ion en *B. subtilis*.

La determinación directa del efecto tóxico del ion soluble de las NPs se realizó con la cantidad del ion Sn^{4+} soluble de las NPs de SnO_2 E2. En base a la cantidad de ión Sn^{4+} que se cuantificó la bacteria *B. subtilis* se expuso a 1, 2.5 y 4 mg/L de iones Sn^{4+} (sal de $SnCl_4.5H_2O$) durante 24 h. La exposición se realizó en incubación a 37°C con agitación constate a 200 rpm. Se utilizaron células sin exposición al ion (controles). El conteo de las células viables se realizó a las 0 y 24 h por medio de la técnica de micro gota en placa (Miles-Misra) en placas de agar LB que se incubaron por 24 h a 37 °C. El cálculo se la viabilidad celular se realizó con el número de UFC/mL de las células expuestas a iones Sn^{4+} fue dividido con el número de UFC/mL del control (Ec. 1).

6.4.7. Determinación de daño a la membrana

El daño a la membrana celular de bacterias y levaduras fue evaluada con el kit de viabilidad celular live-dead BacLight. El kit live-dead está compuesto por dos colorantes o flurocromos (yoduro de propidio (PI) y Syto9). Los colorantes reaccionaron con los componentes de las células, en el caso de Syto 9 se presentó

una interacción con las enzimas esterasas de la célula, mientras que las bacterias con daño celular se tiñeron de color rojo, por la interacción del PI con el ADN que puedo entrar a la célula si la membrana celular se encontraba dañada.

La preparación de la muestra para la tinción con el kit se realizó tomando 1 mL de la dispersión (por duplicado) en el tiempo donde se observó el efecto en la viabilidad celular y se colocó en un tubo epppendorf. La muestra se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces en las condiciones anteriores de centrifugado, al término se resuspendió en 1 mL de solución salina. La tinción de las muestras se realizó en tubos eppendorfs cubiertos con aluminio para evitar el paso de la luz. Se tomó 100 de cada muestra preparada y se adicionaron 0.3 µL de una mezcla en iguales proporciones de los colorantes (Syto9 y PI). Las muestras se homogenizaron y se dejaron en reposo en oscuridad durante 15 min. Después del tiempo de incubación las muestras se lavaron dos veces (10,000 rpm) con solución salina 0.8%, se resuspendieron en 20 µL de solución salina. En el microscopio láser confocal (LSM 700 Zeiss), se tomaron 10 imágenes en campos diferentes de cada muestra. Las condiciones de excitación-emisión máximas para estos fluorocromos son alrededor de 480/500 nm para Syto9 y 490/635 nm para PI.

6.4.8. Análisis de imágenes de microscopía confocal

El análisis de las imágenes tomadas con microscopía confocal se realizó con el software ImageJ (V 1.49). El software cuantificó células vivas, comprometidas y muertas en muestras sin exposición y con exposición a las NPs con efecto tóxico. El análisis fue realizado en el formato original de la imagen (8 bits, 512 x 512 píxeles) como imágenes TIFF. Las imágenes fueron separadas en los canales rojo y verde para las células vivas y muertas. El umbral de los canales fue ajustado para obtener imágenes binarias por separado con pixeles verdes o rojos. En el caso de las imágenes binarias de pixeles amarillos-naranjas, la imagen de pixeles fue obtenida por medio de la función “colocalization” del software, se estableció el punto medio entre el umbral de los pixeles verde y rojo. Todas las imágenes binarias se

analizaron a través de la función "analyze particle", se ajustó el tamaño de las unidades de pixeles (4-500 unidades de pixeles), así como la forma de elipses para contar las células, no se tomaron en cuenta en el conteo de las células de los bordes de la imagen. Los datos obtenidos se analizaron en Excel en donde se obtuvo la media y el error estándar. Al final el porcentaje de los tipos de células, se estimó con la relación de la media de las células verdes, rojas o amarillas, tomando en cuenta la media total de las células contadas por imagen.

6.4.9. Análisis estadístico

Los ensayos realizados fueron hechos por duplicado y triplicado, con lo cual se obtuvieron las medias y desviaciones estándar. Los datos del análisis de ImagenJ se procesaron a través del software R-project con el test de Dunnet en $p<0.05$. Las diferencias significativas de las células vivas, muertas o comprometidas entre tratamientos y controles se indicaron con la marca *.

6.4.10. Daño estructural y composición de células por microscopía electrónica de barrido.

Se corroboró el daño a la membrana celular por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB), en el equipo MET (Jeol JSM-7401F). Se prepararon muestras de dispersiones de células sin exposición y con exposición a 1000 mg/L de NPs de SnO_2 a las 24 h de exposición. Por medio de centrifugación se recuperaron células (1 mL), las cuales fueron resuspendidas en glutaraldehído al 3% durante 2 h a 4 °C para su fijación. Enseguida las células fueron lavadas dos veces con buffer milloning (10 mL) y filtradas a través de una membrana de policarbonato con diámetro de poro de 0,2 μm. El siguiente paso fue la deshidratación de la muestra por medio de gradientes de concentración de etanol (30 a 100%) durante 10 min en cada concentración. La muestra fue colocada en un soporte de aluminio para MET y se le realizó un baño iónico con oro durante 30 segundos a 40 mA (DeskII Denton Vacuum). La observación de imágenes se hizo con el detector de electrones secundarios y el análisis elemental de las muestras se realizó por la técnica de energía dispersiva de rayos X (EDS, Oxford Inca PentaFETX3).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Síntesis de las nanopartículas inorgánicas

En el presente trabajo se usaron diferentes métodos de síntesis; precipitación alcalina, calcinación y tratamientos hidrotérmicos, en base a estudios reportados. (A.S. et al., 2010; Tirado-Guízar et al., 2015; Vásquez et al., 2016).

7.1.1. Nanopartículas de CuO

Los métodos usados en la síntesis de NPs fueron; precipitación alcalina descrito por Lange (2010). Se usó como precursor el acetato de cobre ($Cu(CH_3COO)_2$) y como agente estabilizador el hidróxido de sodio (NaOH) (Ec 2, 3).

$$Cu^{2+} + NaOH \xrightarrow{\text{Agitación}} Cu(OH)_2 + 2Na^+ \quad \textbf{(Ec 2)}$$

$$Cu(OH)_2 \xrightarrow{\triangle} CuO + H_2O \quad \textbf{(Ec 3)}$$

En la reacción de síntesis de las NPs se presentó una coloración negra, en el tiempo de enfriamiento en la solución se observó la precipitación de un polvo negro (NPs de CuO). Está reacción de síntesis de precipitación alcalina, se ha utilizado por varios autores (Anandan & Yang, 2007; Rahnama & Gharagozlou, 2012).

7.1.2. Nanopartículas de SnO_2

En la síntesis de NPs de SnO_2 sin dopar se usaron dos metodologías. Las NPs esféricas de menor tamaño y de forma flor fueron sintetizadas con un método hidrotérmico (Vazquez, et al. 2016), en donde la cantidad del NaOH fue la clave para obtener las diferentes morfologías. Un exceso de NaOH (0.9 M) produjo NPs en forma de flor, mientras que menores cantidades de NaOH (0.3 M) se presentaron NPs en forma esférica. La reacción de la síntesis indicó que la baja cantidad de NaOH formó precipitados de $Sn(OH)_4$, los cuales fueron precursores de las NPs esféricas (Ec 4, 5).

$$SnCl_4 + 4NaOH \longrightarrow Sn(OH)_4 + 4NaCl \quad \textbf{(Ec 4)}$$

$$Sn(OH)_4 \longrightarrow SnO_2 + 2H_2O \quad \textbf{(Ec 5)}$$

En la síntesis de NPs tipo flor una cantidad mayor del NaOH, produjo una sobresaturación de iones de $Sn(OH)_6^{-2}$, siendo estos los precursores para la formación de las barras, las cuales al agregarse originaron una forma tipo flor (Ec 6, 7).

$$SnCl_4 + 6NaOH \longrightarrow Na_2[Sn(OH)_6] + 4NaCl \quad \textbf{(Ec 6)}$$

$$Na_2[Sn(OH)_6] \longrightarrow Sn(OH)_4 + 2NaOH \longrightarrow SnO_2 + 2H_2O \quad \textbf{(Ec 7)}$$

Se sintetizaron NPs SnO_2 esféricas con un tratamiento de calcinación a 350 °C. El tratamiento de calcinación es un método de síntesis en el cual la temperatura se vinculó a las características de las NPs sintetizadas (A., M.A., A.Y., & M.N., 2014).

7.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas inorgánicas.

Las características de forma, tamaño y composición de las NPs, están muy relacionadas con el efecto tóxico causado.

En la caracterización de las NPs de CuO se obtuvieron NPs de forma esférica con un tamaño primario promedio de 5 nm (Fig 19A), en la composición química, se detectó la presencia de los elementos Cu y O con un 77.61 y 15.72 % en peso respectivamente (Fig 19B). Estos datos nos indicaron que se obtuvieron NPs puras, es decir, sin contaminación por otros elementos. Solamente el carbono, se presentó con un bajo porcentaje (6.67 % peso), la presencia de este elemento se relacionó con la síntesis de las NPs. La caracterización de la fase cristalina de las NPs por DRX (Fig 19C) presentó picos sin impurezas, corroborando la pureza de las NPs. El espectro de las NPs de CuO presenta picos delgados debido al tamaño de la partícula, la intensidad y posición de estos se corroboró con datos reportados (JCPDS archivo No. 05-661).

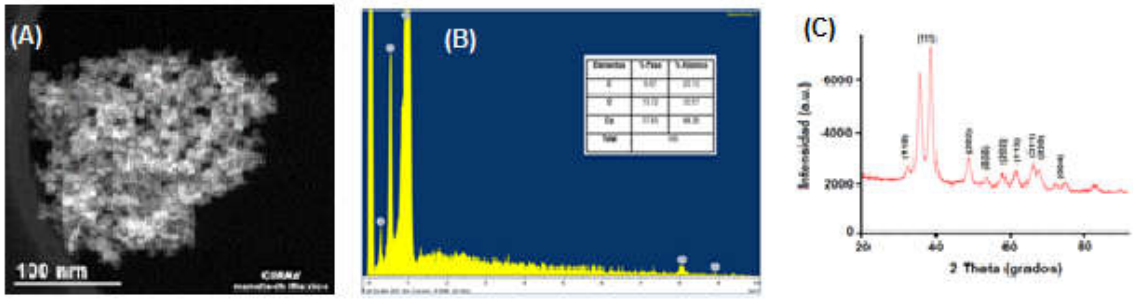


Fig 19 Imagen de MET **(A),** composición elemental **(B)** y fase cristalina **(C)** de las nanopartículas de CuO.

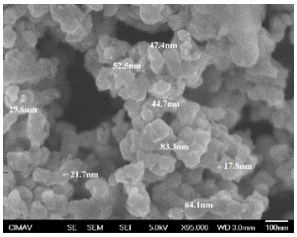
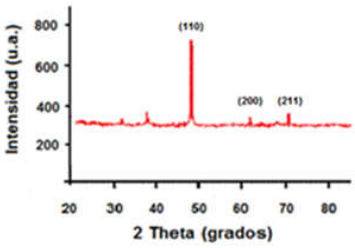
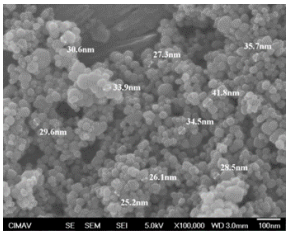
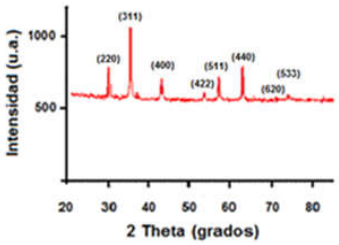
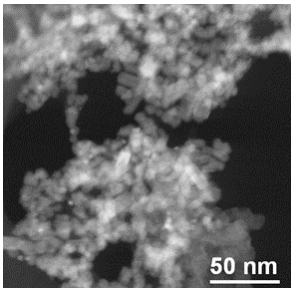
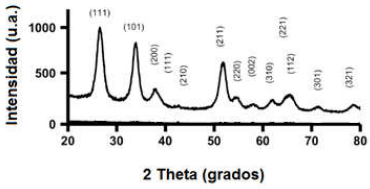
En la Tabla 2 se presenta un resumen de la caracterización de las NPs, en donde de manera general se observó un tamaño primario de 2-85 nm, la mayoría presentó una forma esférica, excepto una de las NPs de SnO_2 con forma tipo flor con tamaño primario de 800 nm.

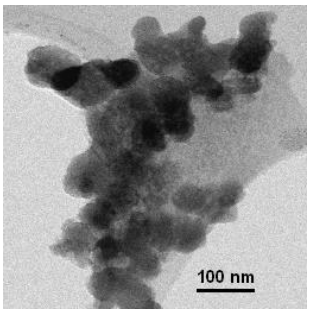
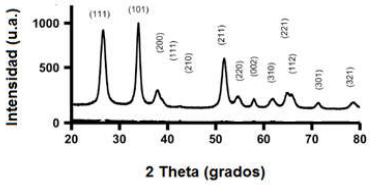
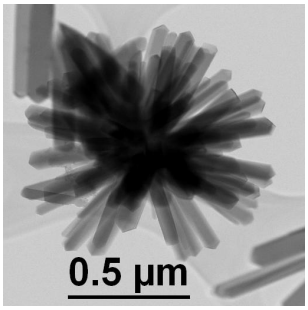
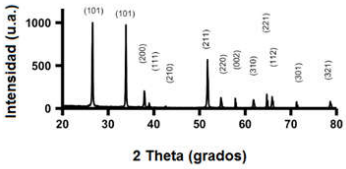
En la determinación de la composición química de las NPs de Fe_3O_4 se presentó un porcentaje en peso de Fe y de O de 33.40 y 3.29, respectivamente. En las NPs de Fe° se encontraron elementos como el Cl, Si, Na y O, los cuales se atribuyeron a la síntesis, sin embargo se obtuvo un 68.05% de % en peso de Fe (Tabla 2). El espectro de las NPs de Fe° presento en la fase cristalina el pico característico de difracción de (110) en un ángulo de difracción de 44.6°. Así mismo, en las NPs de magnetita se obtuvieron los picos correspondientes al espectro de magnetita (Azcona et al., 2016).

Las NPs de SnO_2, presentaron dos formas esféricas y flor, así como dos tamaños de NPs esféricas de 2 nm y 40 nm, por lo cual a estas NPs se les dio el nombre de E2 y E40, respectivamente. En la forma tipo flor el diámetro de la forma es de 800 nm y se identificaron como NPs F800, las cuales presentaron varillas de longitud de 400-600 nm. La composición elemental de las NPs de SnO_2 fue determinada por EDS en donde se observó la presencia de Sn y O. Los porcentajes en peso del Sn y O obtenidos del análisis EDS, fueron de 73.2 y 11.9, respectivamente, esto corresponde a NPs de SnO_2 puras. La presencia del aluminio se debe al soporte en

cual se colocó la muestra para su observación. Los picos de difracción correspondieron con la estructura del rutilo tetragonal del SnO_2 (JCPDS tarjeta 041-1445). No se observaron otros picos que indicaran impurezas, confirmando una fase cristalina pura de NPs de SnO_2 (Tabla 2).

Tabla 2 Características fisicoquímicas de las NPs inorgánicas

Nanopartículas	**Tamaño primario (nm)**	**Forma**	**Fase cristalina (DRX)**
Fe°	30-85	Esférica (MEB) 	Hierro elemental 
Fe_3O_4	25-42	Esférica (MEB) 	Magnetita 
SnO_2	2	Esférica (MET) 	Óxido de estaño 

SnO_2	40	Esférica (MET) 	Óxido de estaño 
SnO_2	800	Flor (MET) 	Óxido de estaño 

7.3. Estabilidad de las nanopartículas en los medios biológicos.

El tamaño y la carga superficial son parámetros importantes en la evaluación de toxicidad de NPs ya que pueden interactuar con los componentes del medio acuoso y/o aglomerarse (Y. Li, Niu, Zhang, Zhang, & Shang, 2014). El tamaño hidrodinámico de las NPs fue determinado en los medios biológicos LB y YPD (0.1X). En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de este parámetro. En las NPs de CuO se hizo la determinación del tamaño en solución salina (NaCl 0.8%) en donde se presentaron en promedio un tamaño hidrodinámico de 274+/-116. En él medio LB, las NPs de CuO presentaron el menor tamaño hidrodinámico (188+/-19). Los tamaños hidrodinámicos de las NPs de CuO indicaron una aglomeración, ya que a comparación del tamaño primario (5 nm), el tamaño hidrodinámico en los medios biológicos fue mucho mayor. En reportes previos se observó la aglomeración de las NPs de CuO, en donde NPs con un tamaño primario de 33.20+/-6.18 nm presentaron un tamaño hidrodinámico de 235 nm (Laha et al, 2014)

y en estudios en el medio YPD, se presentó la aglomeración de las NPs con tamaño primario de 30 nm y con un tamaño hidrodinámico de 2561 nm (Kasemets, Suppi, Künnis-Beres, & Kahru, 2013).

En las NPs de SnO_2 los tamaños hidrodinámicos promedios para las NPs E2, E40 y F800 SnO_2 fueron de 226+/-96, 860+/-107 y 453+/-92 nm, respectivamente (Tabla 3). Las NPs esféricas tienden a aglomerarse por la alta energía superficial de las NPs, como consecuencia del menor tamaño, debido a esto se el tamaño primario y el tamaño hidrodinámico es tan diferente. Esto se observó en las NPs SnO_2 E2 con un tamaño primario menor de 2 nm pero con un tamaño hidrodinámico de casi 100 veces mayor (226+/-96 nm), y en base a los resultados de las otras muestras de NPs presentaron el tamaño hidrodinámico más pequeño. Este tipo y tamaño de aglomeración las NPs esféricas es comparable con otras NPs como ZnO y TiO_2 (Y. Li et al., 2014; Suppi et al., 2015). En el caso de las NPs F800 nm el tamaño hidrodinámico fue menor que el tamaño primario, esta diferencia se atribuyó a problemas en la medida de la dispersión, por la forma tipo flor que no es una estructura compacta. En reportes previos con materiales con forma de hoja, kiwi y cebolla se presentaron tamaños hidrodinámicos ligeramente inferiores o superiores a los tamaños obtenidos en la caracterización por MET (Dag, Lu, & Stenzel, 2015; Dong, Badea, Poorghorban, Verrall, & Foldvari, 2015; Laha et al., 2014).

Las NPs de Fe_3O_4 presentaron aglomeración en los diferentes medios biológicos, con valores muy altos en comparación de las demás NPs analizadas, esto se relacionó a las propiedades magnéticas de las NPs. En estudios previos se determinó el tamaño hidrodinámico con este tipo de NPs en donde se recomendó el uso de surfactantes con el objetivo de aumentar las fuerzas de repulsión y con ello provocar una mayor dispersión, presentando agregados menores de 100-200 nm (Peeters, Lespes, Zuliani, Ščančar, & Milačič, 2016). En las NPs de Fe°, la empresa que las fabrica incluyó un dispersante fabricado en la empresa, con el objetivo de evitar el fenómeno de la aglomeración. El uso de este dispersante ayudó a que las NPs de Fe° presentaron un tamaño hidrodinámico menor (150+/-11 nm),

en comparación de las NPs de magnetita (1082+/-213), en donde no se usó ningún dispersante.

Los valores del potencial zeta de las NPs presentaron una carga negativa en los medios biológicos, lo cual se relaciona con el pH del medio (7.2+/-0.2) que es mayor que el punto isoeléctrico de las NPs. Por ejemplo, el punto isoeléctrico del SnO_2 es de 4-5.5 y en Fe_3O_4 el valor es de 6.5 a 6.8. Por lo cual las cargas negativas predominaron por la presencia de átomos de oxígeno. En trabajos anteriores la estabilidad de las dispersiones de NPs respecto a la carga superficial esta entre los valores de +/-20 a +/-30 mV (da Rosa et al., 2015), en base a estos reportes los valores de carga superficial o potencial zeta de las diferentes dispersiones de las NPs de encuentran en general en el rango de dispersiones estables (Tabla 3).

Tabla 2 Características de las nanopartículas en los medios biológicos

	Medio LB		**Medio YPD**	
Nanopartículas	**Tamaño hidrodinámico (nm)**	**Potencial zeta (mV)**	**Tamaño hidrodinámico (nm)**	**Potencial zeta (mV)**
CuO	188+/-19	-21+/-10	215+/-116	-18+/-9
SnO_2 E2	226+/-96	-30+/-10	171+/-60	-36+/-10
SnO_2 E40	860+/-107	-23+/-8	712+/-147	-26+/-4
SnO_2 F800	453+/-92	-23+/-8	328+/-63	-26+/-6
Fe°	150+/-11	-28+/-8	357+/-24	-28+/-8
Fe_3O_4	1082+/-213	-20+/-9	1105+/-217	-27+/-5

7.4. Toxicidad de nanopartículas inorgánicas.

La toxicidad de las NPs en los microorganismos se evaluó en concentraciones de 100-1000 mg/L con un tiempo de exposición máxima de 24 h En la tabla 4 se observa la toxicidad causada por las NPs a los diferentes modelos biológicos ambientales.

Tabla 3 Efecto tóxico de las NPs inorgánicas

Nanopartículas / **Modelos biológicos**	**CuO**	**SnO_2 (2 nm)**	**SnO_2 (40 nm)**	**SnO_2 (800 nm)**	**Fe_3O_4**	**Fe°**
S. cerevisiae	-	-	-	-	-	-
E. coli	20%*	-	-	-	-	-
B. subtilis	IC_{50}>400 mg/L	IC_{50}>500 mg/L	-	-	-	-

*Porcentaje de inhibición en base al control (600 mg/L)
- No se presentó inhibición hasta 1000 mg/L

7.4.1. Toxicidad de NPs de Fe° y Fe_3O_4

Las NPs inorgánicas de Fe° y Fe_3O_4 no presentaron efecto tóxico en los modelos biológicos expuestos a una concentración de 1000 mg/L en un tiempo exposición de 24. El efecto no tóxico de estas NPs se relacionó con el tiempo de exposición, concentración y la agregación de estas en el medio. En reportes anteriores se determinó que en valores de carga superficial estables, las NPs presentaron fuerzas electrostáticas que impidieron la interacción con la célula (Chen 2011). Por otra parte la agregación de las NPs se relacionó con la concentración y el tiempo, esto

ocasionado por las altas concentraciones que producen una mayor agregación y a mayor tiempo de exposición se produce la sedimentación de las NPs evitando la interacción con las células (Fajardo et al., 2013).

7.4.2. Toxicidad de NPs de CuO

La exposición a las NPs de CuO se realizó en las bacterias Gram negativa (*E. coli)* y Gram positiva (*B. subtilis)* y en la levadura S. *cerevisiae*. En la Fig 21 se presentan las cinéticas de exposición (100-800 mg/L). La bacteria *B. subtilis*, a la segunda hora de exposición en las concentraciones de 600 y 800 mg/L presentó una disminución total en la viabilidad celular (Fig 20a). En base a los resultados anteriores se determinó la concentración inhibitoria estimada del 50% (IC_{50}) a las dos horas de exposición 497 mg/L a las 2 h de exposición a las NPs. En el caso de la bacteria *E. coli* (Fig 20b) se presentó un una disminución del 20% en la viabilidad celular y en la levadura *S. cerevisiae* no presentó toxicidad a las 24 h de exposición a estas NPs.

En el trabajo presentado por Laha (2014) se evaluarón NPs de CuO de formas esférica y tipo hoja, con potencial zeta negativo, diferentes tamaños hidrodinámicos por la forma de las NPs y con exposición bacterias Gram positivas y negativas. En los resultados de Laha obtuvieron determinaron diferentes concentraciones mínimas inhibitorias para cada modelo biológico, demostrando que la toxicidad de las NPs de CuO depende de varios factores como el tamaño, forma de la NP y la naturaleza o composición de los modelos biológicos evaluados. Las concentraciones de exposición a las NPs fueron más bajas (0- 0.4 mg/mL), que las evaluadas en el presente trabajo.

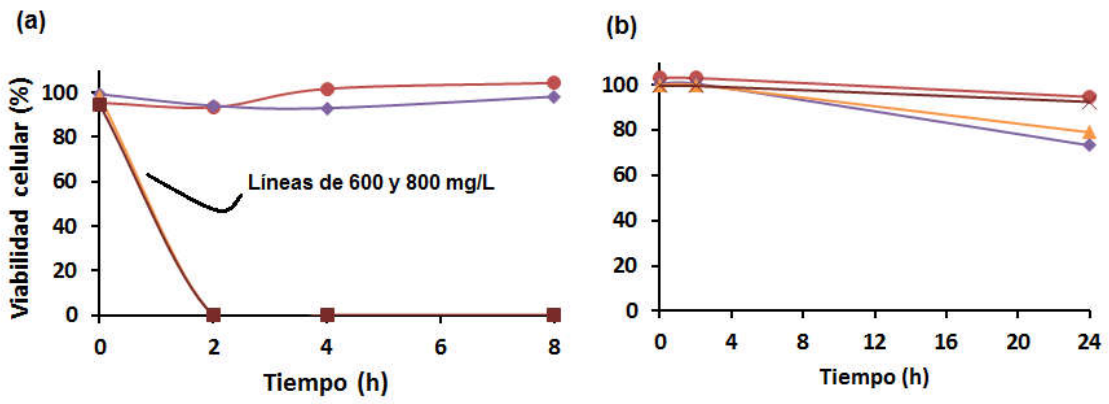


Fig 20 Viabilidad celular de *B. subtilis* **(A)** y *E. coli* **(B)** en función del tiempo con diferentes concentraciones de NPs de CuO (mg/L): 100 (●), 400(◆), 600 (▲) y 800 (■).

7.4.3. Toxicidad de NPs de SnO_2

La evaluación de la toxicidad de las NPs de SnO_2, en la bacteria Gram negativa *E. coli*, se determinó mediante una cinética de exposición a las NPs de SnO_2 E2, E40 y F800 (0, 8 y 24 h) en donde no se observó inhibición en la viabilidad celular en concentraciones de 200 a 1000 mg/L de NPs. En estudios anteriores se ha demostrado que las bacterias Gram negativas presentan mayor sensibilidad a las NPs ya que penetran la membrana celular o bien generan un daño oxidativo por la producción de ERO/ROS (Laha et al., 2014; Lin et al., 2014). En el caso específico de la evaluación de la toxicidad de NPs de SnO_2 en *E. coli* se han realizado pocos estudios. Un trabajo resiente con este tipo de NPs evaluaron diferentes formas; esférica y tipo coliflor (70-90 nm), con surfactantes, los cuales promovieron el efecto toxico de las NPs bajo condiciones de luz visible, en cambio en la exposición a NPs sin surfactantes se presentó una mayor actividad fotocatalítica con luz ultravioleta (Talebian & Sadeghi Haddad Zavvare, 2014). Uno de los mecanismos propuestos de toxicidad de las NPs de SnO_2 es la producción de ERO/ROS causado por el efecto fotocatalítico de las NPs bajo luz ultravioleta o luz visible (Vidhu & Philip, 2015).

En el modelo biológico de bacteria Gram positiva (*B. subtilis*) se determinó efecto en la viabilidad celular. Las NPs de SnO_2 E4 y F800 con concentraciones de 200 a 1000 mg/L, en un tiempo de exposición de 24 h, no presentaron efecto tóxico en *B. subtilis*. En cambio las NPs E2 en un tiempo de exposición de 24 h se redujo la viabilidad celular en un 65% en una concentración de 500 mg/L y en las concentraciones de 800 y 1000 mg/L se presentó una inhibición del 100% (Fig 21).

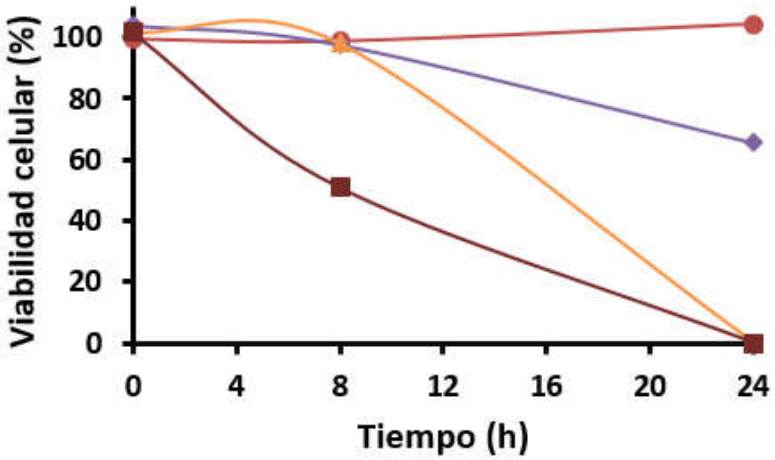


Fig 21 Viabilidad celular de *B. subtilis* en función del tiempo con diferentes concentraciones de NPs de SnO_2 (mg/L): 200 (●), 500(◆), 800 (▲) y 1000 (■).

El efecto de las NPs SnO_2 E2 en la bacteria *B. subtilis*, es resultado de una mayor interacción con las moléculas cargadas positivas (ácidos lipoteicoicos) en la membrana de las bacterias Gram positivas, por el menor tamaño hidrodinámico, la carga superficial negativa y la estabilidad de las NPs SnO_2 E2 en el medio. En comparación con las NPs F800, en donde no se presentó toxicidad se relacionó con la baja interacción con la célula ocasionado por la forma de la NP, en donde la parte final de las barras interacciona con la superficie de la célula. La influencia en la forma de las NPs es importante por el alineamiento con la superficie de la célula, en el caso de las NPs esféricas presentaron más contacto a diferencia de los

nanotubos o las NPs en forma de hoja, flor, coliflor, etc., ocasionando que las NPs esféricas tuvieran más efecto toxico en las células (Tong et al., 2013).

La diferencia del efecto tóxico entre los modelos Gram positivos y Gram negativos se relacionó con la diferencia en la composición de la membrana y el modo de interacción entre las células y las NPs. En reportes anteriores las bacterias Gram positivas mostraron ser más sensibles a NPs con carga negativa debido a que en la superficie de la célula se presentan cargas positivas (Jesuvathy Sornalatha, Bhuvaneswari, Murugesan, & Murugakoothan, 2015; Laha et al., 2014). En el presente estudio, se sugiere que el tamaño menor y la carga negativa presente en la NP interaccionó con la superficie celular con carga positiva de los ácidos lipoteicoicos, los cuales se encuentran en la capa de peptidoglicano de las membranas de las bacterias Gram positivas, ocasionando un daño a la membrana celular y con ello una alteración en la función celular. Previamente, Jiang (2009) describió las interacciones principales de NPs de óxidos metálicos (ZnO, TiO_2, Al_2O_3) en biomoléculas de la superficie de la célula bacteriana, con la formación de enlaces hidrógeno e intercambio de ion. Otras interacciones se pueden presentar, como la formación de enlaces iónicos, hidrofóbicos y fuerzas electrostáticas.

En base a los datos de viabilidad celular de *B. subtilis,* que se expuso a NPs de SnO_2 E2, se determinó la IC_{50}>500 mg/L. En la búsqueda de información al respecto, no se encontró información de valores reportados de IC_{50} para NPs de SnO_2 en bacterias. Talebian (2014) reportó la completa inhibición de células de *E. coli* en una concentración estimada de 750 mg/L de NPs de SnO_2 esférico de 61 nm, bajo iluminación UV, pero no se determinó el valor de IC_{50}.

En el caso del modelo de célula eucariota *S. cerevisie* no presentó toxicidad en las NPs SnO_2 E2, E40 y F800. El modelo biológico *S. cerevisiae* se ha evaluado la toxicidad en varias NPs como en el trabajo presentado por Garcia-Saucedo (2011), en donde las NPs evaluadas de HfO_2, SiO_2, Al_2O_3 y CeO_2 presentaron una baja toxicidad en este modelo en concentraciones relevantes para el medio ambiente (1000 mg/L).

7.5. Mecanismos de toxicidad de las NPs con efecto tóxico.

7.5.1. Mecanismo de toxicidad de las NPs de CuO

Se han descrito diversos mecanismos de toxicidad de las NPs de CuO, entre los cuales se describió la ionización del Cu^{2+}, que se relacionó con la composición química del medio acuoso en el que se hizo la evaluación (Gunawan, Teoh, Marquis, & Amal, 2011; M. Li et al., 2011).

En el presente trabajo se determinó la cantidad de Cu^{2+} soluble en los diversos medios biológicos LB y YPD en concentraciones de 100 y 600 mg/L. En la concentración de 600 mg/L en el medio LB, se cuantificó en el tiempo cero, 30.31 mg/L de Cu^{2+}, a las 2 h se cuantificaron 86.78 mg/L del ion soluble de CuO y a las 24 h aumento a 125 mg/L. En el medio YPD no se presentó efecto tóxico en la levadura, pero aun así se presentaron concentraciones altas del ion como se puede observar en la Fig 22 en la concentración de 600 mg/L a las 2 h se cuantificaron 271.23 mg/L de Cu^{2+}. En estudios previos se observó que particularmente por la composición del medio YPD, las nanopartículas de CuO se ionizaron en mayor medida ya que los aminoácidos, péptidos y materia orgánica que estaba presente interaccionaron con las NPs lo que provocó dos procesos simultáneos i) la ionización del cobre aumentó por la dispersión del CuO facilitado por la composición del medio y ii) la formación de complejos del cobre ionizado con los componentes del medio rico en proteínas evitó la interacción con las células, ocasionando un mayor efecto tóxico (Kasements, et al., 2013)

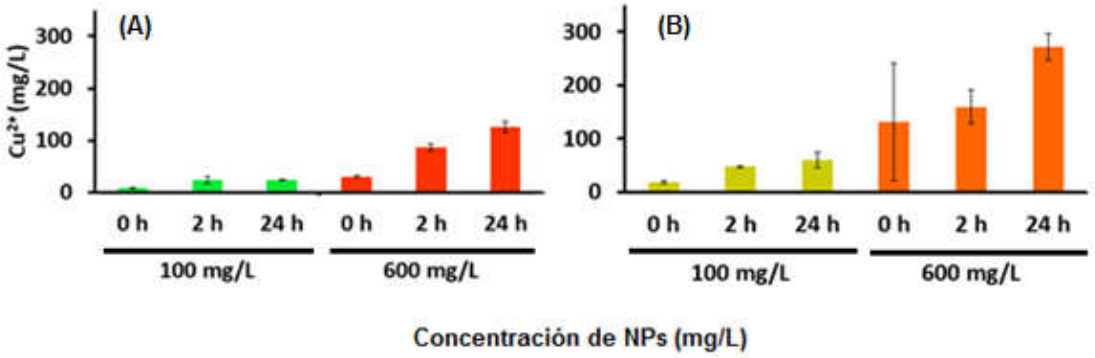


Fig 22 Concentración de iones Cu^{2+} de NPs de CuO en los medios LB **(A)** y YPD **(B)**

En base a lo anterior, por la presencia de la ionización del cobre en los medios ricos en proteínas, se realizó la evaluación de la toxicidad de las NPs de CuO en *B. subtilis* en el medio NaCl 0.8% con la finalidad de determinar si la ionización del cobre en el medio LB es el mecanismo de toxicidad de estas NPs. En el medio NaCl 0.8%, no se encontró disminución en la viabilidad celular de la bacteria, la cuantificación del ion cobre en este medio fue de de 0.38 mg/L a las 2 h, en el medio NaCl 0.8% (Fig 23). Esto indicó que el mecanismo de toxicidad de las NPs de CuO está vinculado con la ionización del Cu^{2+} en él medio LB.

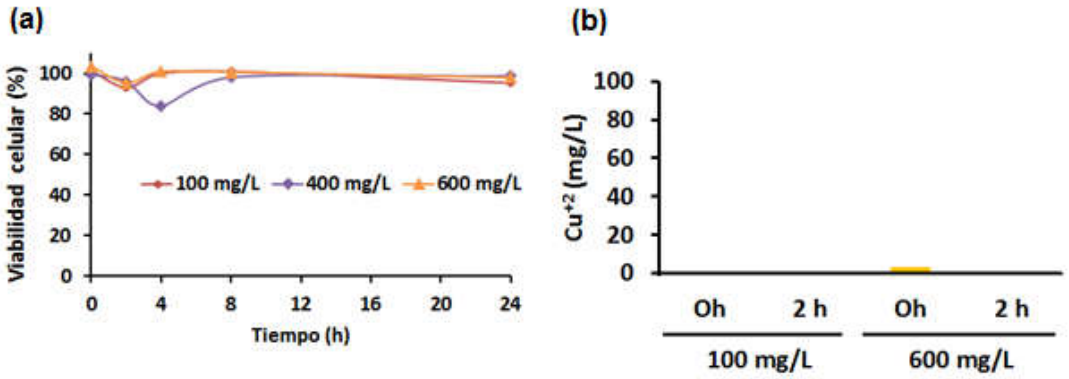


Fig 23 Viabilidad celular de *B. subtilis* **(a)** y concentración de iones Cu^{2+} **(b)** de NPs de CuO en el medio NaCl 0.8%

7.5.2. Mecanismo de toxicidad de NPs de SnO_2

El efecto tóxico de NPs que contienen metales se vinculó con la ionización de los metales tóxicos (Chang et al., 2012; Song et al., 2010). En reportes previos el SnO_2 es un compuesto con baja solubilidad en medios acuosos y en la cuantificación de la solubilidad en NPs de SnO_2 (70-92 nm) se ha reportado una baja ionización (0,1 y 0,2 ng/L) en medio salino fisiológico (Talebian y Sadeghi Haddad Zavvare, 2014). Con el fin de saber si la ionización de NPs de SnO_2 E2 contribuyó a la toxicidad, se midió la cantidad de iones de Sn^{4+} en dispersiones en las concentraciones de 200, 500, 800 y 1000 mg/L en medio LB se incubaron durante 0, 8 y 24 h a 37 ºC. En las dispersiones analizadas la cantidad más alta de Sn^{4+} fue de 2,2 ± 0,9 mg/L, lo que representó sólo el 0,2% del total de Sn en la dispersión de 1000 mg/L de SnO_2 NP (Fig. 24).

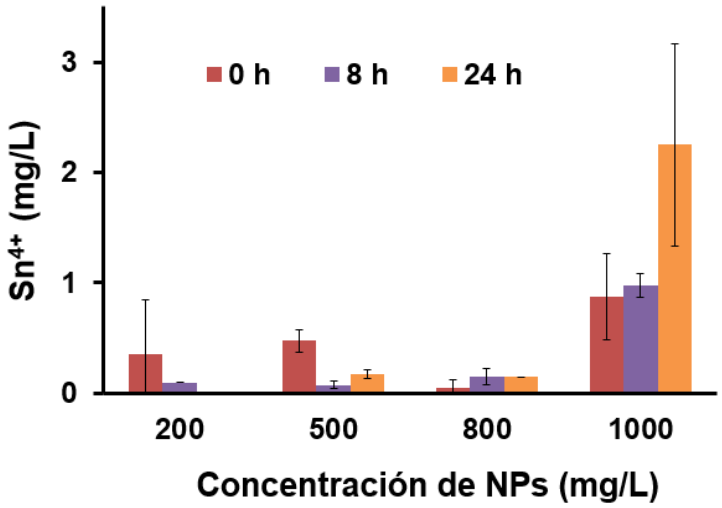


Fig 24 Ion soluble de Sn^{4+} de NPs SnO_2 E2 en medio el LB

La determinación del efecto del ion soluble de Sn, se realizó mediante la exposición de *B. subtilis* al ion en concentraciones de 1, 2.5 y 4 mg/L durante 24 h en las mismas condiciones de los ensayos de toxicidad. En la Fig 25 se puede observar que en las diferentes concentraciones de ion Sn no se encontró toxicidad en *B. subtilis*. Esto concuerda con los resultados previos reportados por Han y Cooney en 1995 en donde reportaron los valores Sn^{4+} de IC_{50} de 111 y 130 mg/L del ion

expuesto a *P. fluorescens* y *Serratia sp*. Estos resultados confirman que el efecto tóxico de SnO_2 NPs de *B. subtilis* fue causado únicamente por NPs.

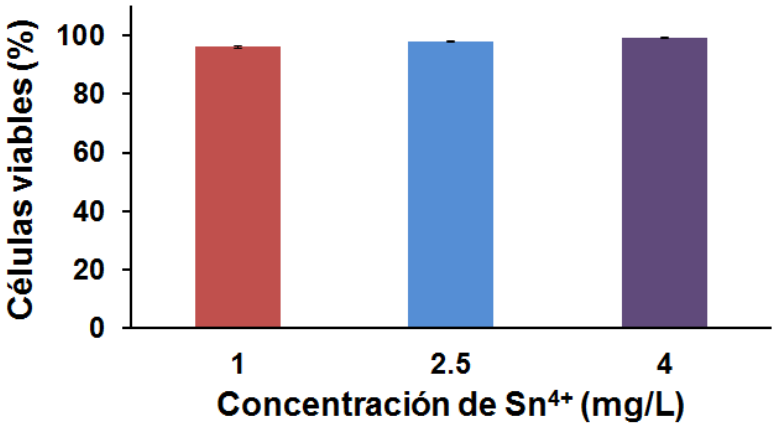


Fig 25 Viabilidad celular de *B. subtilis* expuesto a diferentes concentraciones del ion Sn^{4+} (24 h)

La estabilidad de las dispersiones de NPs de SnO_2 se corroboró mediante la cuantificación del SnO_2, de la fracción dispersa (sobrenadante) a las 0 y 2 h de incubación en las mismas condiciones de los ensayos de toxicidad. Las dispersiones tenían una concentración de 250 mg/L, las cantidades obtenidas (Fig 26) fueron moderadamente más altas a el tiempo de 0 h a diferencia de las 2 h. En base a estos resultados se confirmó que las dispersiones de las NPs de SnO_2 E2 son muy estables, ya que más de la mitad de las NPs totales estaban en dispersión, seguidas por E40 y F800 NPs. Esto es consistente con el valor más alto de potencial zeta para las NPs E2. Es importante mencionar que aún con la aglomeración de estas NPs, el tamaño hidrodinámico de estos agregados es el más pequeño de este tipo de NPs. y con mayor tendencia a dispersarse en el medio en comparación con E40 y F800 NPs. El menor tamaño hidrodinámico y mayor estabilidad observada para NPs de SnO_2 E2 podría favorecer su interacción con células y su efecto de toxicidad.

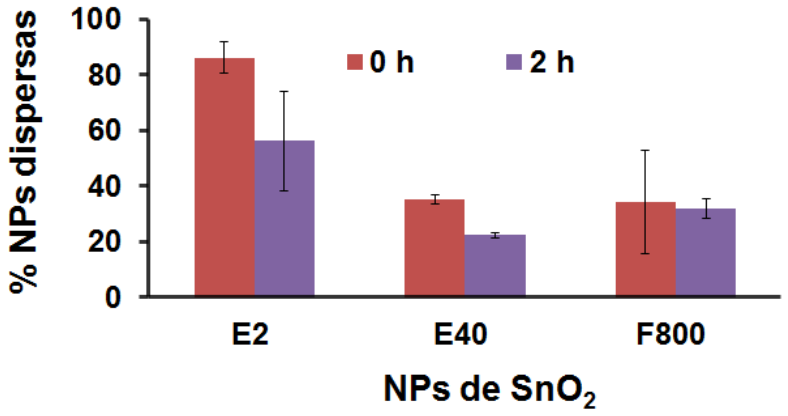


Fig 26 Fracción dispersa (sobrenadante) de las dispersiones de NPs de SnO_2 en medio LB.

En base a lo anterior, se estudió el mecanismo de toxicidad causado por las NPs de SnO_2, evaluando si estas afectan la integridad de la membrana de *B. subtilis*. Se prepararon muestras de células expuestas a NPs de SnO_2 E2, E40 y F800 durante 24 h, las cuales fueron analizadas a través de microscopia confocal, después de realizar la tinción de las muestras usando dos colorantes que distinguen el daño a la membrana como se describó en la metodología. El análisis se llevó a cabo en un total de 10 imágenes por muestra, se usó células sin exposición y células expuestas a NPs en diferentes concentraciones. En la Fig 27 se muestran imágenes de microscopia confocal en donde las células control (Fig 27A) predominan células teñidas de color verde, indicando que la membrana de celular estaba intacta. En cambio en la imagen (Fig 27B) de células expuestas a NPs SnO_2 E2 predominaron las células color rojo, amarillas y algunas verdes, lo que indicó un daño a la membrana celular, esto se relacionó con los resultados de viabilidad celular en donde estas NPs presentaron una inhibición total de la viabilidad celular. En el caso de las células expuestas a E40 y F800 (Fig 27C y D, respectivamente) se presentaron células en su mayoría color verde lo que indicó poco daño a la membrana de las células expuestas a estas NPs.

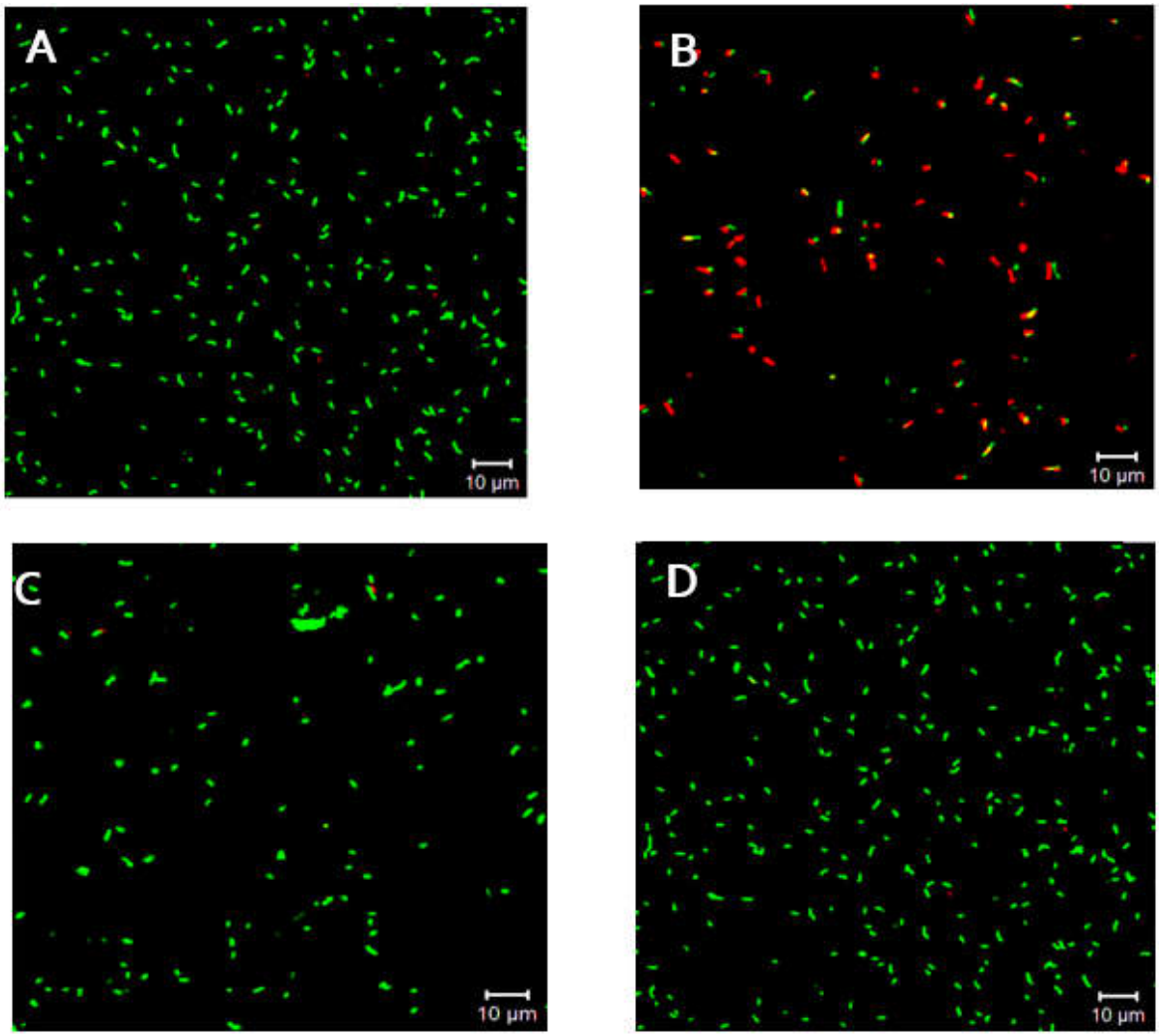


Fig 19 Imágenes de microcopia confocal de células de *B. subtilis* tenidas con Syto9 (colorante verde, sin daño en la membrana) y PI (colorante rojo, daño en la membrana). Células comprometidas se tiñen de color amarillo y naranja. Células no expuestas **(A)** y las células expuestas a 1000 mg/L de E2 **(B**), E40 **(C)** y F800 **(D)** NPs de SnO_2

Las imágenes de microscopía confocal se analizaron con el software ImageJ con el fin de estimar el porcentaje de células vivas, comprometidas y muertas. Este porcentaje se determinó mediante el conteo de las células con el software como se indica en la metodología. En la Fig 28, se presentan los resultados en porcentaje del análisis, en donde las células sin exposición tuvieron un mayor porcentaje de células vivas (95.4%). En cambio los porcentajes de células expuestas a 500 y 100

mg/L de NPs de SnO_2 ES, el porcentaje de células vivas disminuyó significativamente a 72% (500 mg/L) y el 30% (1000 mg/L) y el porcentaje de células comprometidas aumentó significativamente a 28% y 50%, respectivamente. En el caso de las células muertas se presentó un 20% en las células expuestas a la concentración de 1000 mg/L de NPs E2, este porcentaje se relacionó con la reducción en la viabilidad celular causada por estas NPs. Aún y cuando este porcentaje de células rojas no es tan significativo como el efecto que se observó de inhibición total en la viabilidad celular, esto se relacionó con que la mayoría de las células no estaban activas metabólicamente para que se obtuvieran en el conteo en placa. Esta inactivación de la división celular en las células intactas bajo estrés se ha descrito anteriormente (Codony, Agustí, & Allué-Guardia, 2015).

En cuanto a las células expuestas a las NPs E40 el porcentaje de células vivas y comprometidas fue menor de un 75 y 23% respectivamente, al presentado por las NPs E2. El porcentaje de daño celular más bajo fue el causado por la exposición a las NPs F800 en donde solo se presentó un 17% de células comprometidas, este porcentaje no presenta una diferencia significativa en base a los porcentajes de las células control.

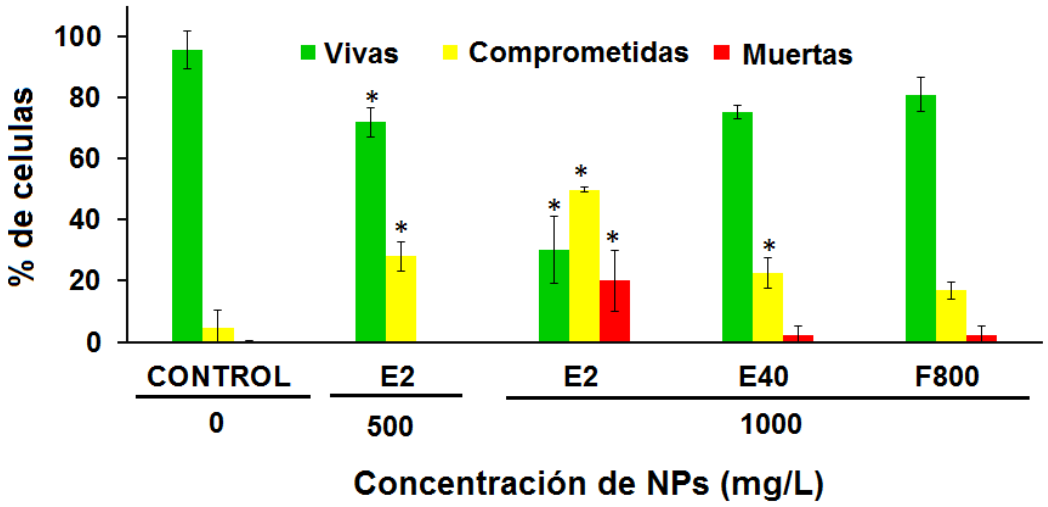


Fig 28 Efecto de la exposición a NPs de SnO_2 en el daño de la membrana de la célula de *B. subtilis*. Se obtuvieron los porcentajes de células vivas, muertas y comprometidas mediante el conteo de células realizadas en imágenes de microscopia confocal

El daño a la membrana se corroboró por medio de MEB en donde células *B. subtilis* fueron expuestas a 1000 mg/L de E2 en tiempos de 0 y 24 h. Las imágenes se muestran en la Fig 29. Las imágenes de las células no expuestas a las 0 y 24 h de incubación (Fig. 29A y 29C, respectivamente) mostraron las células sin daño de la membrana o cambios morfológicos. Del mismo modo que en las células sin exposición, no se observó ningún daño de las células en el tiempo cero, solo aglomerados de nanopartículas se observaron claramente en la superficie de las células (Fig. 29B). En cambio, la imagen de las células expuestas a E2 NPs durante 24 h (Fig. 29D) mostró claramente daños en la superficie de la célula como la pérdida de integridad de la membrana y cambios morfológicos como la elongación de las células. La pérdida de integridad de la membrana puede ser ocasionada por la salida o la hidrólisis de los componentes celulares, provocando cambios morfológicos y la interrupción de la función celular.

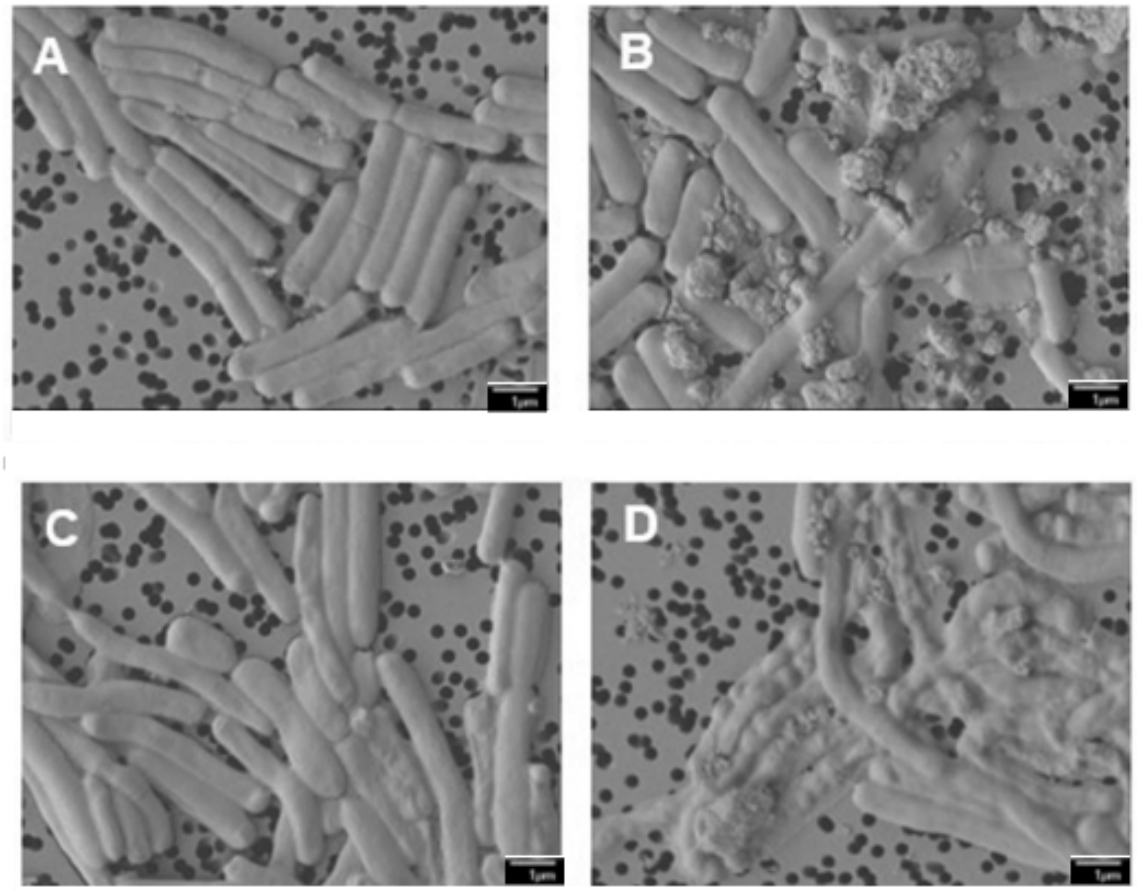
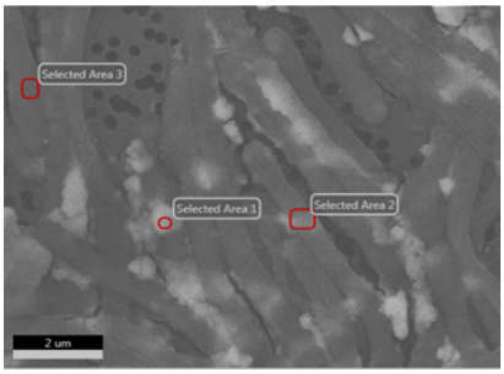


Fig 29 Imágenes de MET de las células *B. subtilis*: muestras de las células no expuestas se incubaron de 0 y 24 h (A y C, respectivamente) y las células expuestas a 1000 mg/L de NPs SnO_2 E2 para 0 y 24 h (B y D, respectivamente).

En imágenes de MEB acoplada al análisis EDS, se analizaron los aglomerados de NPs en la superficie de la célula de *B. subtilis* y fueron identificadas con base en la detección de los elementos de Sn y O (Fig 30). Las observaciones de MEB corroboran el daño de la integridad de la membrana y cambios estructurales de *B. subtilis* causada por las NPs de SnO_2 en la superficie celular, que confirmaron el mecanismo propuesto de la toxicidad de las nanopartículas.

(A)



(B)

Elemento	Área 1 (% Peso)	Área 2 (% Peso)	Área 3 (% Peso)
C	19.41	51.50	83.82
O	13.87	14.72	16.18
Sn	66.72	33.78	0.0
Total	100.00		

Fig 30 Imagen de MEB **(A)** y la composición elemental **(B)** células de *B. subtilis* expuesta a 1000 mg/L de NPs SnO_2 E2 (EDS).

7.6. Nanopartículas de SnO_2 dopadas

La síntesis y desarrollo de NPs dopadas, potencializa las propiedades fotocatalíticas y eléctrica de estas (Mishra & Sahay, 2012; Tirado-Guízar et al., 2015). Por lo cual surgió el interés en la evaluación de nanopartículas ya que se contó con los resultados previos en donde NPs con el mismo tamaño, forma ocasionaron un efecto toxico en uno de los modelos evaluados, por lo tanto, fue de interés determinar si el elemento dopante puede intervenir en el efecto tóxico de estas NPs.

La síntesis de NPs de SnO_2 dopadas se realizó con un método hidrotérmico. El uso de urea como agente reductor, la alta temperatura y presión generaron amoníaco produciendo una reducción *in situ* lo que generó NPs muy pequeñas. La adición del metal dopante se llevó a cabo por medio de sales solubles en concentraciones más bajas que el precursor (Bhattacharjee et al., 2015; Tirado-Guízar et al., 2015). En la Tabla 5 se observa la caracterización realizada a las NPs de SnO_2 dopadas. La forma de las NPs es esférica y con tamaños primarios en el promedio de 2-3 nm. El análisis elemental mostró el porcentaje atómico de los elementos de Sn, O mostrando una alta pureza, así como el porcentaje del metal dopante, el cual fue en el orden de 1.4 a 3.2%.

Tabla 4 Caracterización fisicoquímica de NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar

Nanopartículas	Análisis por MET		Análisis por EDS (% atómico)		
	Tamaño primario (nm)	**Forma**	**Sn**	**O**	**Metal dopante**
SnO_2	2.2+/-0.4	Esférica	38.8+/-7	61.2+/-7	0
SnO_2-Zn	2.4+/-0.2	Esférica	32.3+/-6	65.7+/-6	2.1+/-0.6
SnO_2-Fe	2.3+/-0.3	Esférica	28.4+/-2	68.6+/-2	3.1+/-0.6
SnO_2-Ti	2.8+/-0.4	Esférica	25.3+/-3	71.5+/-3	3.2+/-0.3

Los espectros de DRX de las NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar (Fig 31). La estructura tetragonal del rutilo del SnO_2 la cual fue comparada con la tarjeta ICDD No. 77-0452. No se presentaron la presencia de otros picos que pudieron indicar contaminación. En cuanto al material dopante no presentó picos en el espectro, esto indicó que el porcentaje de estos metales es menor al 10% atómico, cumpliendo con el porcentaje adecuado para clasificar a las NPs como dopadas.

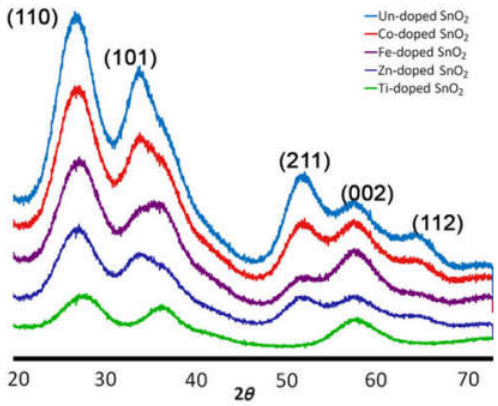


Fig 31 Espectro de difracción de rayos X de NPs de SnO_2 dopadas (Tirado-Guízar et al., 2015)

La estabilidad de las NPs dopas en los medios LB y YPD (Tabla 6), se determinó por medio del tamaño hidrodinámico en donde presentaron tamaños parecidos a las NPs de SnO_2 sin dopar E2, indicando que el metal dopante no influye en la aglomeración de las NPs. En estudios de tamaños hidrodinámicos de NPs dopadas se observó que el metal dopante aumenta significativamente el tamaño hidrodinámico como en las NPs de ZnO dopadas con Fe y Mn en donde las NPs sin dopar presentaron un tamaño de 499.1±68.4 nm y las NPs dopados con Fe y Mn de 679.0±171.0 y 516.0±89.2 nm respectivamente (Yin & Casey, 2014). La carga superficial de las NPs dopadas en los dos medios biológicos fue negativa con valores de carga estables (±20 a ±30 mV) (da Rosa et al., 2015).

Tabla 5 Características de las NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar en los medios biológicos.

Nanopartículas	**Medio LB**		**Medio YPD**	
	Tamaño hidrodinámico (nm)	**Potencial zeta (mV)**	**Tamaño hidrodinámico (nm)**	**Potencial zeta (mV)**
SnO_2	226+/-96	-30+/-10	171+/-60	-36+/-10
SnO_2-Ti	281+/-36	-26+/-8	252+/-45	-29+/-5
SnO_2-Zn	172+/-22	-23+/-7	193+/-35	-27+/-7
SnO_2-Fe	60+/-3	-17+/-7	219+/-23	-29+/-6

En la exposición a NPs de SnO_2 dopadas, se llevó a cabo en un tiempo de exposición de 24 h en dos concentraciones de 200 y 1000 mg/L en donde se observó un efecto en la viabilidad celular en diferentes porcentajes como se muestra en la tabla 7. En el caso de las NPs dopadas se hizo la exposición durante 24 h no encontrando efecto en las bacterias Gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa* en

concentraciones de 200 y 1000 mg/L. El efecto tóxico en los modelos Gram positivos expuestos a NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar se relacionó con el tipo de membrana celular y la forma esférica de las NPs (Tabla 7). El tamaño de las NPs se ha relacionado ampliamente con su efecto toxico en los diversos sistemas biológicos estudiados, en donde las NPs más pequeñas generan mayor efecto tóxico (Karlsson, Gustafsson, Cronholm, & Möller, 2009). El estudio presentado por Lin (2014) donde evaluaron NPs de TiO_2 con dos tamaños primarios de 10 y 50 nm, mostraron mayor actividad tóxica las NPs con un menor tamaño hidrodinámico y primario.

En estudios previos con NPs dopadas se ha relacionó el efecto tóxico con el tipo de metal dopante y la composición de la NP. Wu en 2010 evaluó la toxicidad de NPs de TiO_2-Cu dopadas y sin dopar, determinando que las NPs dopadas con un mayor porcentaje del metal dopante (1.8%) presentaron un efecto tóxico en la bacteria *M. smegmatis*. En el caso de las NPs de ZnO dopadas con Fe y Mn, se observó una menor ionización del zinc en las NPs dopadas con Fe, y el mecanismo de toxicidad fue la producción de especies reactivas de oxígeno y no por la ionización del Zn que normalmente ocurre con este tipo de NPs (Yin, et al., 2014). Por lo que el efecto tóxico de las NPs dopadas, está muy relacionado con la composición química de estas.

Tabla 6 Efecto tóxico de las NPs de SnO_2 dopadas y sin dopar en diferentes modelos biológicos

MICROORGANISMO	**Porcentaje de inhibición celular**			
	SnO_2	**SnO_2-Fe**	**SnO_2-Ti**	**SnO_2-Zn**
B. subtilis	100	0	60	20
S. aureus	-	30	20	20

E. coli	0	0	0	0
P. aeruginosa	-	0	0	0
C. albicans	-	0	0	0
S. cerevisiae	0	13.47	0	25.64

- No se realizó la exposición del microorganismo a esta NP.

8. CONCLUSIONES.

- El efecto tóxico de las NPs de CuO, se relacionó con la solubilización de los iones Cu^{2+} en el medio de cultivo. Mientras que la toxicidad de las NPs SnO_2 en *B. subtilis* se asoció a la interacción de las cargas negativas de las NPs con las cargas positivas de moléculas presentes en la membrana de las células Gram positivas (D-alanina), provocando un daño en la membrana celular.
- La gran interacción de las NPs SnO_2 E2 con las células puede deberse a su tamaño hidrodinámico más pequeño y mayor estabilidad (carga y dispersión) en el medio biológico, comparado con las NPs E40 y F800, Resultando en mayor efecto tóxico.
- Los microorganismos ambientales más sensibles a NPs podrían ser las bacterias Gram positivas y las NPs con mayores efectos tóxicos podrían ser aquellas con tamaños primarios < 10 nm.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el mecanismo de toxicidad de las NPs de SnO_2 dopadas para comparar con los resultados obtenidos con las NPs sin dopar y determinar si hay una diferencia en el mecanismo de toxicidad por efecto del metal dopante.

REFERENCIAS

A., G., M.A., A.-R., A.Y., A.-L., & M.N., A.-S. (2014). Influence of Calcination Temperature on the Structure and Porosity of Nanocrystalline SnO_2 Synthesized by a Conventional Precipitation method. *Int. J. Electrochem. Sci, 9*, 81-95.

A.S., L., S.J., S., B., P. R., & R.S., N. (2010). Synthesis and optical characterization of copper oxide nanoparticles. *Advances in Applied Science Research, 1 (2)*, 36-40.

Ab Kadir, R., Li, Z., Sadek, A. Z., Abdul Rani, R., Zoolfakar, A. S., Field, M. R., . . . Kalantar-zadeh, K. (2014). Electrospun Granular Hollow SnO_2 Nanofibers Hydrogen Gas Sensors Operating at Low Temperatures. *The Journal of Physical Chemistry C, 118*(6), 3129-3139. doi:10.1021/jp411552z

Anandan, S., & Yang, S. (2007). Emergent methods to synthesize and characterize semiconductor CuO nanoparticles with various morphologies – an overview. *Journal of Experimental Nanoscience, 2*(1-2), 23-56. doi:10.1080/17458080601094421

Antizar-Ladislao, B., Bhattacharya, B. D., Ray Chaudhuri, S., & Sarkar, S. K. (2015). Impact of silver nanoparticles on benthic prokaryotes in heavy metal-contaminated estuarine sediments in a tropical environment. *Marine Pollution Bulletin, 99*(1–2), 104-111. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.051

Azcona, P., Zysler, R., & Lassalle, V. (2016). Simple and novel strategies to achieve shape and size control of magnetite nanoparticles intended for biomedical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 504*, 320-330. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.064

Baek, Y.-W., & An, Y.-J. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb_2O_3) to *Escherichia coli, Bacillus subtilis*, and *Streptococcus*

aureus. *Science of The Total Environment, 409*(8), 1603-1608. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014

Bhattacharjee, A., Ahmaruzzaman, M., & Sinha, T. (2015). A novel approach for the synthesis of SnO_2 nanoparticles and its application as a catalyst in the reduction and photodegradation of organic compounds. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 136, Part B*(0), 751-760. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.092

Cabeen, M. T., & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nat Rev Micro, 3*(8), 601-610. doi:http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n8/suppinfo/nrmicro1205_S1.html

Codony, F., Agustí, G., & Allué-Guardia, A. (2015). Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR. *Molecular and Cellular Probes, 29*(3), 190-192. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2015.03.003

Chang, Y.-N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., & Xing, G. (2012). The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials, 5*(12), 2850-2871. doi:10.3390/ma5122850

Chaúque, E. F. C., Zvimba, J. N., Ngila, J. C., & Musee, N. (2014). Stability studies of commercial ZnO engineered nanoparticles in domestic wastewater. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C, 67–69*, 140-144. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pce.2013.09.011

da Rosa, C. G., de Oliveira Brisola Maciel, M. V., de Carvalho, S. M., de Melo, A. P. Z., Jummes, B., da Silva, T., . . . Barreto, P. L. M. (2015). Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids and Surfaces A:*

Physicochemical and Engineering Aspects, 481, 337-344. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.05.019

Dag, A., Lu, H., & Stenzel, M. (2015). Controlling the morphology of glyco-nanoparticles in water using block copolymer mixtures: the effect on cellular uptake. *Polymer Chemistry, 6*(45), 7812-7820. doi:10.1039/C5PY01360G

Dalai, S., Pakrashi, S., Kumar, R. S. S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2012). A comparative cytotoxicity study of TiO_2 nanoparticles under light and dark conditions at low exposure concentrations. *Toxicology Research, 1*(2), 116-130. doi:10.1039/C2TX00012A

De Matteis, V., Malvindi, M. A., Galeone, A., Brunetti, V., De Luca, E., Kote, S., . . . Pompa, P. P. (2015). Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of Ag^+ ion release in the cytosol. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11*(3), 731-739. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2014.11.002

Dolez, P. I. (2015). Chapter 1.1 - Nanomaterials Definitions, Classifications, and Applications *Nanoengineering* (pp. 3-40). Amsterdam: Elsevier.

Dong, C., Badea, I., Poorghorban, M., Verrall, R., & Foldvari, M. (2015). Impact of phospholipids on plasmid packaging and toxicity of gemini nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B, 3*(45), 8806-8822. doi:10.1039/C5TB01400J

Fajardo, C., Ortíz, L. T., Rodríguez-Membibre, M. L., Nande, M., Lobo, M. C., & Martin, M. (2012). Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: A molecular approach. *Chemosphere, 86*(8), 802-808. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.041

Fajardo, C., Saccà, M. L., Martinez-Gomariz, M., Costa, G., Nande, M., & Martin, M. (2013). Transcriptional and proteomic stress responses of a soil bacterium

Bacillus cereus to nanosized zero-valent iron (nZVI) particles. *Chemosphere, 93*(6), 1077-1083. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.082

Gandhi, S., Subramani, R. H. H., Ramakrishnan, T., Sivabalan, A., Dhanalakshmi, V., Nair, M. R. G., & Anbarasan, R. (2010). Ultrasound assisted one pot synthesis of nano-sized CuO and its nanocomposite with poly(vinyl alcohol). *Journal of Materials Science, 45*(6), 1688-1694. doi:10.1007/s10853-009-4158-4

García-Saucedo, C., Field, J. A., Otero-Gonzalez, L., & Sierra-Álvarez, R. (2011). Low toxicity of HfO_2, SiO_2, Al_2O_3 and CeO_2 nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials, 192*(3), 1572-1579. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.081

Ge, Y., Schimel, J. P., & Holden, P. A. (2011). Evidence for Negative Effects of TiO2 and ZnO Nanoparticles on Soil Bacterial Communities. *Environmental Science & Technology, 45*(4), 1659-1664. doi:10.1021/es103040t

Gunawan, C., Teoh, W. Y., Marquis, C. P., & Amal, R. (2011). Cytotoxic Origin of Copper(II) Oxide Nanoparticles: Comparative Studies with Micron-Sized Particles, Leachate, and Metal Salts. *ACS Nano, 5*(9), 7214-7225. doi:10.1021/nn2020248

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. d., Rojo, T., . . . Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology, 30*(10), 499-511. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004

Harris, J. R. (2015). Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 581*, 3-18. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.011

Hoa, N. D., Van Quy, N., Jung, H., Kim, D., Kim, H., & Hong, S.-K. (2010). Synthesis of porous CuO nanowires and its application to hydrogen detection. *Sensors*

and Actuators B: Chemical, 146(1), 266-272. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2010.02.058

Jang, M.-H., Lim, M., & Hwang, Y. S. (2014). Potential environmental implications of nanoscale zero-valent iron particles for environmental remediation. *Environmental Health and Toxicology, 29*, e2014022. doi:10.5620/eht.e2014022

Jesuvathy Sornalatha, D., Bhuvaneswari, S., Murugesan, S., & Murugakoothan, P. (2015). Solochemical synthesis and characterization of ZnO nanostructures with different morphologies and their antibacterial activity. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics, 126*(1), 63-67. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijleo.2014.07.138

Jiang, W., Yang, K., Vachet, R. W., & Xing, B. (2010). Interaction between Oxide Nanoparticles and Biomolecules of the Bacterial Cell Envelope As Examined by Infrared Spectroscopy. *Langmuir, 26*(23), 18071-18077. doi:10.1021/la103738e

Jin, W. X., Ma, S. Y., Tie, Z. Z., Li, W. Q., Luo, J., Cheng, L., . . . Mao, Y. Z. (2015). Synthesis of hierarchical SnO2 nanoflowers with enhanced acetic acid gas sensing properties. *Applied Surface Science, 353*, 71-78. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.06.089

Ju-Nam, Y., & Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment, 400*(1–3), 396-414. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042

Kahru, A., & Dubourguier, H.-C. (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology, 269*(2–3), 105-119. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016

Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE, 6*(2), e16015. doi:10.1371/journal.pone.0016015

Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., & Möller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters, 188*(2), 112-118. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.014

Kasemets, K., Suppi, S., Künnis-Beres, K., & Kahru, A. (2013). Toxicity of CuO Nanoparticles to Yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Wild-Type and Its Nine Isogenic Single-Gene Deletion Mutants. *Chemical Research in Toxicology, 26*(3), 356-367. doi:10.1021/tx300467d

Kumar, A., Pandey, A. K., Singh, S. S., Shanker, R., & Dhawan, A. (2011). Engineered ZnO and TiO_2 nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radical Biology and Medicine, 51*(10), 1872-1881. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.025

L., C., F., G., M, G., & D., M. (2013). Applications of Magnetite Nanoparticles for Heavy Metal Removal from Wastewater. *Waste Water - Treatment Technologies and Recent Analytical Developments*. doi:http://dx.doi.org/10.5772/54608

Laha, D., Pramanik, A., Laskar, A., Jana, M., Pramanik, P., & Karmakar, P. (2014). Shape-dependent bactericidal activity of copper oxide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Materials Research Bulletin, 59*(0), 185-191. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.06.024

Li, K.-N., Wang, Y.-F., Xu, Y.-F., Chen, H.-Y., Su, C.-Y., & Kuang, D.-B. (2013). Macroporous SnO_2 Synthesized via a Template-Assisted Reflux Process for

Efficient Dye-Sensitized Solar Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces, 5*(11), 5105-5111. doi:10.1021/am4009727

Li, M., Pokhrel, S., Jin, X., Mädler, L., Damoiseaux, R., & Hoek, E. M. V. (2011). Stability, Bioavailability, and Bacterial Toxicity of ZnO and Iron-Doped ZnO Nanoparticles in Aquatic Media. *Environmental Science & Technology, 45*(2), 755-761. doi:10.1021/es102266g

Li, Y., Niu, J., Zhang, W., Zhang, L., & Shang, E. (2014). Influence of Aqueous Media on the ROS-Mediated Toxicity of ZnO Nanoparticles toward Green Fluorescent Protein-Expressing Escherichia coli under UV-365 Irradiation. *Langmuir, 30*(10), 2852-2862. doi:10.1021/la5000028

Lin, X., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yang, K., Tong, M., & Lin, D. (2014). Toxicity of TiO_2 Nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of Particle Size, Crystal Phase and Water Chemistry. *PLoS ONE, 9*(10), e110247. doi:10.1371/journal.pone.0110247

Lowry, G. V., Gregory, K. B., Apte, S. C., & Lead, J. R. (2012). Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology, 46*(13), 6893-6899. doi:10.1021/es300839e

Luxbacher, T. (2014). Principles of the streaming potential technique. *Anton-Paar GmgH*, 9-118.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, M. G., Brock, T. D., Fernández, C. R., & Pérez, M. S. (2004). *Brock biología de los microorganismos*: Pearson Educación.

Majumder, B. K. K. a. M. K. (2015). Carbon Nanotube Based VLSI Interconnects. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology,* . doi:DOI 10.1007/978-81-322-2047-3_2

Marquis, B. J., Love, S. A., Braun, K. L., & Haynes, C. L. (2009). Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst, 134*(3), 425-439.

Maurer-Jones, M. A., Gunsolus, I. L., Murphy, C. J., & Haynes, C. L. (2013). Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Analytical chemistry, 85*(6), 3036-3049. doi:10.1021/ac303636s

Minor, M., van der Linde, A. J., van Leeuwen, H. P., & Lyklema, J. (1997). Dynamic Aspects of Electrophoresis and Electroosmosis: A New Fast Method for Measuring Particle Mobilities. *Journal of Colloid and Interface Science, 189*(2), 370-375. doi:http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1997.4844

Mishra, R. K., & Sahay, P. P. (2012). Zn-doped and undoped SnO_2 nanoparticles: A comparative structural, optical and LPG sensing properties study. *Materials Research Bulletin, 47*(12), 4112-4118. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.08.051

Niska, K., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2015). CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: Protective effect of crocetin. *Toxicology in Vitro, 29*(4), 663-671. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.004

Peeters, K., Lespes, G., Zuliani, T., Ščančar, J., & Milačič, R. (2016). The fate of iron nanoparticles in environmental waters treated with nanoscale zero-valent iron, FeO NPs and Fe3O4NPs. *Water Research, 94*, 315-327. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.004

Peralta-Videa, J. R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hong, J., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. *Journal of Hazardous Materials, 186*(1), 1-15. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.020

Rahnama, A., & Gharagozlou, M. (2012). Preparation and properties of semiconductor CuO nanoparticles via a simple precipitation method at different reaction temperatures. *Optical and Quantum Electronics, 44*(6), 313-322. doi:10.1007/s11082-011-9540-1

Ray, P. C., Yu, H., & Fu, P. P. (2009). Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. *Journal of Environmental Science and Health, Part C, 27*(1), 1-35. doi:10.1080/10590500802708267

Sajid, M. I., Jamshaid, U., Jamshaid, T., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2016). Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics, 501*(1–2), 278-299. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.064

Schrand, A. M., Rahman, M. F., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Smith, D. A., & Syed, A. F. (2010). Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2*(5), 544-568. doi:10.1002/wnan.103

Schwegmann, H., Feitz, A. J., & Frimmel, F. H. (2010). Influence of the zeta potential on the sorption and toxicity of iron oxide nanoparticles on *S. cerevisiae* and *E. coli. Journal of Colloid and Interface Science, 347*(1), 43-48. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.02.028

Song, W., Zhang, J., Guo, J., Zhang, J., Ding, F., Li, L., & Sun, Z. (2010). Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology Letters, 199*(3), 389-397. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.10.003

Suga, M., Asahina, S., Sakuda, Y., Kazumori, H., Nishiyama, H., Nokuo, T., . . . Terasaki, O. (2014). Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. *Progress in Solid*

State Chemistry, 42(1–2), 1-21. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2014.02.001

Suppi, S., Kasemets, K., Ivask, A., Künnis-Beres, K., Sihtmäe, M., Kurvet, I., . . . Kahru, A. (2015). A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazardous Materials, 286*, 75-84. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.027

Suresh, A. K., Pelletier, D. A., & Doktycz, M. J. (2013). Relating nanomaterial properties and microbial toxicity. *Nanoscale, 5*(2), 463-474. doi:10.1039/C2NR32447D

Talebian, N., & Sadeghi Haddad Zavvare, H. (2014). Enhanced bactericidal action of SnO2 nanostructures having different morphologies under visible light: Influence of surfactant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 130*(0), 132-139. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.10.018

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., & Flank, A. M. (2006). Cytotoxicity of CeO_2 Nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism. *Environmental Science & Technology, 40*(19), 6151-6156. doi:10.1021/es060999b

Thompson, B. C., & Fréchet, J. M. J. (2007). Polymer–Fullerene Composite Solar Cells. *Angewandte Chemie International Edition, 47*(1), 58-77. doi:10.1002/anie.200702506

Tian, Z.-H., Wang, Y.-J., Xu, J.-H., & Luo, G.-S. (2016). Intensification of nucleation stage for synthesizing high quality CdSe quantum dots by using preheated precursors in microfluidic devices. *Chemical Engineering Journal, 302*, 498-502. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.070

Tirado-Guízar, A., Pina-Luis, G. E., & Paraguay-Delgado, F. (2015). Ecofriendly synthesis of ultra-small metal-doped SnO_2 quantum dots. *MRS Communications, 5*(01), 63-69. doi:doi:10.1557/mrc.2015.11

Tong, T., Shereef, A., Wu, J., Binh, C. T. T., Kelly, J. J., Gaillard, J.-F., & Gray, K. A. (2013). Effects of Material Morphology on the Phototoxicity of Nano-TiO_2 to Bacteria. *Environmental Science & Technology, 47*(21), 12486-12495. doi:10.1021/es403079h

Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., & Domingos, R. F. (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquatic Toxicology, 170*, 162-174. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.019

Vásquez, F. C., Paraguay-Delgado, F., Morales-Mendoza, J. E., Antúnez-Flores, W., Lardizabal, D., Alonso-Nuñez, G., & Berhault, G. (2016). Shape and size controlled growth of SnO_2 nano-particles by efficient approach. *Superlattices and Microstructures, 90*, 274-287. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.spmi.2015.12.014

Vidhu, V. K., & Philip, D. (2015). Biogenic synthesis of SnO_2 nanoparticles: Evaluation of antibacterial and antioxidant activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 134*(0), 372-379. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.131

Vittori Antisari, L., Carbone, S., Gatti, A., Vianello, G., & Nannipieri, P. (2013). Toxicity of metal oxide (CeO_2, Fe_3O_4, SnO_2) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil. *Soil Biology and Biochemistry, 60*, 87-94. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.016

Wei, L., Liu, Y., Dubchak, I., Shon, J., & Park, J. (2002). Comparative genomics approaches to study organism similarities and differences. *Journal of*

Biomedical Informatics, 35(2), 142-150. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0464(02)00506-3

Wu, B., Huang, R., Sahu, M., Feng, X., Biswas, P., & Tang, Y. J. (2010). Bacterial responses to Cu-doped TiO_2 nanoparticles. *Science of The Total Environment, 408*(7), 1755-1758. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.004

Yadav, B., & Kumar, R. (2008). Structure, properties and applications of fullerenes. *International Journal of Nanotechnology and Applications, 2*(1), 15-24.

Yin, H., & Casey, P. S. (2014). Effects of iron or manganese doping of ZnO nanoparticles on their dissolution, ROS generation and cytotoxicity. *RSC Advances, 4*(50), 26149-26157. doi:10.1039/C4RA02481H

Zhang, Q., Zhang, K., Xu, D., Yang, G., Huang, H., Nie, F., . . . Yang, S. (2014). CuO nanostructures: Synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications. *Progress in Materials Science, 60*, 208-337. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2013.09.003