



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN BOTÁNICA

**RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Azolla filiculoides* Lam.
A NANOPARTÍCULAS DE ZnO**

GRISELDA SODELVA ZARATE CRUZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.

2015

La presente tesis titulada: **Respuesta fisiológica de *Azolla filiculoides* Lam. a nanopartículas de ZnO** realizada por la alumna: **Griselda Sodelva Zarate Cruz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA MANCERA

ASESOR



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR



DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2015.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo otorgado mediante una beca de maestría para la realización de este postgrado.

A la línea prioritaria de Investigación LPI-16: Innovación Tecnológica por el apoyo económico brindado para la realización de la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados, Montecillo y al área de Botánica por que en sus instalaciones aprendí que con perseverancia, dedicación y trabajo se obtiene éxito.

Al área de Microbiología de Suelos por facilitar su laboratorio e instalaciones.

Y de manera muy especial:

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por su dirección, dedicación y asesoría en este trabajo; pero sobre todo por la confianza, paciencia, apoyo incondicional y enseñanzas.

Al Dr. Alejandro Alarcón por su apoyo, aportaciones y disponibilidad para el buen término de la presente tesis.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez por su disposición y valiosas contribuciones.

Al Dr. Rodolfo García Nava por su atención y apoyo.

Amis compañeros y amigos que compartieron el aula y laboratorio conmigo y con quienes pasamos momentos gratos, por su apoyo y consejos para mejorar este trabajo en especial a Violeta, Naybí, Fátima, Emmanuel, Alfredo, Simón, Columba, Luis.

A mis hermanos por elección Ariadna, Noemí, Itzel, Alíberth, Minerva por su apoyo, cariño, compañía y enseñanzas, pero sobre todo por su gran amistad.

A aquellos a quienes omíto, Gracias!

DEDICATORIA

A la vida por darme una segunda oportunidad de lograr
cada meta que me propongo.

A mis padres por su amor, apoyo, confianza, esfuerzo y dedicación. De
quienes he aprendido que la vida se enfrenta con trabajo y unión familiar.

A mi hermana Angélica por estar conmigo en la etapa más
difícil de mi vida, por su amor y apoyo.

A Martha y Edith por darme la animos para seguir adelante,
su apoyo y amistad sincera.

A mi esposo Carlos a quien agradezco su amor, apoyo y amistad;
pero sobre todo por su paciencia.

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Azolla filiculoides* Lam. A NANOPARTÍCULAS

DE ZnO.

GRISELDA SODELVA ZARATE CRUZ

RESUMEN

Las nanopartículas de ZnO son ampliamente desechadas al ambiente, pero su fitotoxicidad es poco conocida. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto tóxico del tamaño y concentración de ZnO NPs en la respuesta fisiológica del helecho acuático *Azolla filiculoides*. La toxicidad de NPs, grado analítico de Sigma Aldrich (26.7 ± 1 nm) se comparó con la de partículas grado farmacéutico de Farmacia Paris (238 ± 30.7 nm) y las concentraciones 100, 200, 400 mg de NPs ZnO L⁻¹. El diseño fue completamente al azar y los datos se analizaron con ANDEVA y las medias se compararon con Tukey ($p \leq 0.05$). Las observaciones con Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) mostraron que las NPs pequeñas fueron isodiamétricas y las grandes fueron alargadas. Las plantas fueron incubadas en solución nutritiva Yoshida con las NPs, durante 6 d en invernadero. Las NPs pequeñas a la concentración de 400 mg NPs ZnO L⁻¹ redujeron ($p < 0.05$) el crecimiento y la concentración de Chla, Chlb y x+c, y Chl total. La fluorescencia de la clorofila se redujo en todas las concentraciones de NPs, y las partículas pequeñas fueron más tóxicas, reduciendo significativamente ($p < 0.05$) el Fv/Fm. Las NPs chicas (26.7 ± 1 nm) redujeron la actividad antioxidante total y fenoles totales, a 66.5% y 74.5 % respecto a las NPs grandes (238 ± 30.7 nm). La actividad nitrogenasa se redujo 72.6%, 79.4 y 82.7 % en 100, 200 y 400 mgL⁻¹ NPs de ZnO independientemente del tamaño. El microanálisis elemental de Zn con EDS-MEB

indicó mayor abundancia de Zn en el lado abaxial de las frondas y en función de la concentración de NPs. El tamaño de las NPs es más determinante en el grado de toxicidad que la concentración. *A. filiculoides* mostró tolerancia a NPs grandes, pero este fue más susceptible a las NPs pequeñas. La fluorescencia de clorofila y la actividad nitrogenasa fueron buenos indicadores de toxicidad.

Palabras clave: fitotoxicidad, helecho acuático, nanopartículas metálicas, NPs ZnO.

PHYSIOLOGICAL RESPONSE *Azolla filiculoides* Lam. OF NANOPARTICLES ZNO

GRISELDA SODELVA ZARATE CRUZ

ABSTRACT

The nanoparticles of ZnO (ZnO NPs) are largely disposed to the environment but their phytotoxicity is little known. The objective of this research was to evaluate the toxic effect of size and concentration of ZnO NPs on the physiological response of the aquatic fern *Azolla filiculoides*. The toxicity of small NPs, from Sigma Aldrich, analytical grade of (26.7±1 nm) and large particles, from Pharmacy Paris, pharmaceutical grade (238±30.7 nm) and the concentrations 100, 200, 400 mg of NPs ZnO L⁻¹. The design was completely randomized and the data were analyzed with ANOVA and the means were compared with Tukey ($p \leq 0.05$). The observations with Transmission Electron Microscopy (TEM) showed that the small NPs were isodiametric and the large particles were elongated. The plants were incubated in a nutrient solution Yoshida with the NPs, for 6 d in greenhouse. The small NPs (26.7 ± 1nm) at the concentration of 400 mg NPs ZnO¹ L reduced ($p < 0.05$) the growth and concentration of Chla, Chlb and x+c, and total Chl. Chlorophyll fluorescence was reduced in all concentrations of NPs, and the small particles were more toxic, reducing significantly ($p < 0.05$) the Fv/Fm. The small NPs (26.7 ± 1nm) reduced the total antioxidant activity and total phenols, to 66.5% and 74.5% compared to the large NPs (238 ± 30.7 nm). The nitrogenase activity dropped 72.6%, 79.4 and 82.7% in 100, 200 and 400 mgL⁻¹ ZnO NPs regardless of size. The elemental microanalysis of Zn with SEM-EDS indicated greater abundance of Zn on the abaxial of the

fronds and depending on the concentration of NPs. The size of the NPs is more decisive in the degree of toxicity than the concentration. *A. filiculoides* showed tolerance to large NPs, but the aquatic fern was susceptible to the small NPs. Chlorophyll fluorescence and nitrogenase activity were good indicators of toxicity.

Key words: phytotoxicity, aquatic fern, metallic nanoparticles, NPs ZnO.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Nanoestructurados y nanopartículas.....	3
2.2. Nanopartículas de ZnO y TiO ₂	4
2.2.1. Principios de la toxicidad de nanopartículas de ZnO y TiO ₂	5
2.2.2. Toxicidad de nanopartículas de ZnO en animales y microorganismos.....	8
2.2.3. Toxicidad de nanopartículas de ZnO en humanos.....	9
2.2.4. Toxicidad de nanopartículas de ZnO en plantas.....	12
2.3. Plantas acuáticas remediadoras de metales pesados.....	15
2.4. Simbiosistema <i>Azolla-Anabaena azollae</i>	17
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	22
3.1. Objetivo general	22
3.1.1. Objetivos particulares	22
3.2. Hipótesis.....	22
3.2.1. Hipótesis general.....	22
3.2.2. Hipótesis particulares.....	23

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1. Caracterización de nanopartículas de ZnO.....	24
4.2. Material biológico y establecimiento de <i>A. filiculides</i>	25
4.3. Diseño experimental, tratamientos y variables	25
4.4. Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación.....	26
4.5. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	27
4.6. Fluorescencia de clorofila	28
4.7. Actividad antioxidante total	28
4.8. Fenoles totales	29
4.9. Actividad de nitrogenasa	29
4.10. Microanálisis de Zn mediante (EDS-MEB).	30
4.11. Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Caracterización de nanopartículas de ZnO.....	31
5.2. Establecimiento de <i>A. filiculoides</i>	34
5.3. Efecto de NPs de ZnO el el crecimiento de <i>A. filiculoides</i>	34
5.4. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	36
5.5. Fluorescencia de clorofila	36
5.6. Actividad antioxidante total	41
5.7. Fenoles totales	43
5.8. Actividad de nitrogenasa	44
5.9. Microanálisis de Zn mediante (EDS-MEB)... ..	48

6. DISCUSIÓN	51
6.1. Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación de <i>A. filiculoides</i>	51
6.2. Pigmentos fotosintéticos y fluorescencia de clorofila	52
6.3. Antioxidante totales y fenoles totales	54
6.4. Evaluación de actividad de nitrogenasa	57
6.5. Microanálisis de Zn mediante (EDS-MEB).....	59
7. CONCLUSIÓN.....	59
8. LITERATURA CITADA	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Solución nutritiva Yoshida (Yoshida <i>et al.</i> , 1971).....	25
Cuadro 2. Tamaño en índice de redondez de NPs de ZnO de dos procedencias.....	32
Cuadro 3. Crecimiento de <i>A. filiculoides</i> . Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación de <i>A. filiculoides</i> después de 6 días de crecimiento a 19-23 °C.....	34
Cuadro 4. Efecto del tamaño de partícula en pigmentos fotosintéticos de <i>Azolla filiculoides</i> a los 6 días de exposición a tres concentraciones (100, 200, y 400 mg L ⁻¹) de NPs ZnO.....	37
Cuadro 5. Efecto de concentración de NPs de ZnO en pigmentos fotosintéticos de <i>Azolla filiculoides</i> a los 6 días de exposición con partículas y chicas (26.7±1.0 nm) y grandes (238±30.7 nm).....	38
Cuadro 6. Efecto del tamaño de NPs de ZnO en la fluorescencia del fotosistema II de <i>Azolla filiculoides</i>	40
Cuadro 7. Efecto de la concentraciones de NPs de ZnO en la fluorescencia del fotosistema de <i>Azolla filiculoides</i>	40
Cuadro 8. Respuesta de actividad antioxidante total en <i>Azolla filiculoides</i> ante la presencia de NPs de ZnO de dos tamaños diferentes.....	42

Cuadro 9. Efecto de concentración de NPs de ZnO en la respuesta de actividad antioxidante total de <i>Azolla filiculoides</i>	42
Cuadro 10. Efecto del tamaño de NPs de ZnO en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales de frondas de <i>Azolla filiculoides</i>	43
Cuadro 11. Efecto de la concentración de NPs de ZnO en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales de frondas de <i>Azolla filiculoides</i>	44
Cuadro 12. Tasa relativa de reducción de acetileno (RA) por <i>A. filiculoides</i> en presencia de dos tamaños diferentes de NPs de ZnO.....	47
Cuadro 13. Reducción de acetileno (RA) por <i>A. filiculoides</i> en presencia de NPs de ZnO en diferentes concentraciones.....	47
Cuadro 14. Microanálisis de Zn mediante EDS-MEB de <i>A. filiculoides</i> , sometido a tratamientos con NPs de ZnO.....	49

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1. Nanoestructurados. A) nanopartícula metálica; B) nanopartícula core-shell; C) nanopartícula core-shell funcionalizada con moléculas biológicas; D) dendrímero; E) nanocápsula de núcleo líquido; F) nanocápsula con la sustancia activa adsorbida a la pared; G) nanoesfera con nanodominios; H) nanoesfera matricial con la sustancia activa dispersa.....</p>	6
<p>Figura 2. Fuentes de nanopartículas en el ambiente.....</p>	9
<p>Figura 3. Rutas de absorción, translocación y biotransformación de varias nanopartículas en el sistema de la planta propuestas. A) Absorción y translocación selectiva de nanopartículas en la planta; B) corte transversal de la zona de absorción en raíz que muestra las diversas interacciones con nanopartículas a las que está expuesta la planta en el suelo.....</p>	12
<p>Figura 4. Posibles modos de absorción de nanopartículas en plantas.....</p>	13
<p>Figura 5. Helecho heterospórico acuático <i>Azolla filiculoides</i> Lam. A) Flora Británica, (1924); B) recolecta de Ensenada, Baja California, México.....</p>	17
<p>Figura 6. Corte longitudinal de <i>Azolla</i> y <i>Anabaena</i> 1) Tallo; 2) Ápice del tallo; 3) Colonia apical de <i>Anabaena</i> sin heterocistos; 4. Otras bacterias; 5. Primordio foliar; 6. Hoja joven, 7. Filamento pluricelular ramificado; 8. Filamento simple bicelular; 9. Lóbulo hoja superior. 10. Lóbulo hoja inferior; 11. Cavidad de la hoja; 12. Megaesporocarpo; 13. Indusia; 14. Esporocarpo; 15. Microsporangia; 16. Microesporocarpo; 17. Microesporangio; 18. Acinetes de <i>Anabaena</i>; 19. Células vegetativas de <i>Anabaena</i>; 20. Heterocisto.....</p>	18
<p>Figura 7. Mapa de distribución de <i>Azolla filiculoides</i> en México, según los registros del Herbario MEXU, Instituto de Biología, UNAM</p>	19

Figura 8. Análisis de morfología, tamaño y frecuencias de NPs de ZnO con Microscopía Electrónica de Transmisión. A) y B) NPs grado analítico (Sigma-Aldrich); C) y D) NPs grado farmacéutico; A) y C) micrografías electrónicas que muestran la morfología de NPs; B) y D) frecuencias de intervalos de tamaños. Tamaños promedio de NPs de grado analítico y de grado farmacéutico en cinco micrografías; n= 80..... 33

Figura 9. Análisis de crecimiento de *A. filiculoides* expuesta a tres concentraciones de NPs durante 6 días. A) Tasa relativa de crecimiento (TRC); B) tasa de duplicación (TD). Media \pm error estándar; n=9. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PS: peso seco..... 35

Figura 10. Contenido de pigmentos fotosintéticos en *Azolla filiculoides* a los 6 d de exposición a cuatro concentraciones de NPs de ZnO. A) NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm); B) NPs grandes (238 ± 30.7 nm). Media \pm error estándar; n=9. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo pigmento (Tukey $p \leq 0.05$); PF: peso fresco..... 39

Figura 11. Rendimiento fotoquímico máximo del PSII de *Azolla filiculoides* a los tratamientos con NPs de ZnO pequeña (26.7 ± 1 nm) y grande (238 ± 30.7 nm) expuestas durante 6 días. Media \pm error estándar, n=9. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$)..... 41

Figura 12. Respuesta antioxidante de *Azolla filiculoides* a los tratamientos con NPs de ZnO pequeñas (26.7 ± 1 nm) y grandes (238 ± 30.7 nm) expuestas durante 6 días. Media \pm error estándar, n=9. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PF: peso fresco..... 45

Figura 13. Compuestos fenólicos solubles totales en frondas de *Azolla filiculoides* expuesta a tres concentraciones de NPs de ZnO pequeñas (26.6 ± 1) y grandes (268 ± 30) expuestas durante 6 días. Media \pm error estándar, n = 9. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PF: peso fresco..... 46

Figura 14. Actividad nitrogenasa medida por la reducción de acetileno por *Azolla filiculoides* en presencia de NPs de ZnO pequeñas (26.7 ± 1 nm) y grandes (238 ± 30.7 nm) a los 6 días. Media \pm error estándar, n=5. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PS: peso seco.....

48

Figura 15. Micromorfología de frondas de *A. filiculoides* expuesta a NPs de ZnO (400 mg L^{-1}). A) Micrografía de superficie adaxial de frondas sin presencia de NPs de ZnO pequeñas (26.7 ± 1 nm); B) Superficie abaxial de fronda con presencia de NPs de ZnO pequeñas agregadas; C) Micrografía de superficie adaxial de frondas sin presencia de NPs de ZnO grandes (238 ± 30.7 nm); D) Superficie abaxial con NPs grandes de ZnO agrgadas.....

50

1. INTRODUCCION

Las nanopartículas (NPs) son materiales de dimensiones nanométricas (1×10^{-9} m). El uso de NPs ha cobrado gran interés debido a las propiedades fisicoquímicas únicas como: alta razón superficie-volumen, forma (cuasi esferas, barras, discos, prismas); y agregación, propiedad físico-química superficial, solubilidad, propiedades magnéticas y fotoeléctricas, bloqueo UV y otras. El rango de aplicaciones novedosas en electrónica, química, biotecnología, medicina, cosmetología, ingeniería de materiales, aeronáutica, ciencias de alimentos, entre otras aumenta cada día.

El desarrollo de la nanotecnología ha generado la elaboración de nanopartículas y su introducción al ambiente, incluyendo aire y agua. Sin embargo, el número de estudio sobre el impacto de las nanopartículas en la salud humana y la vida salvaje ha incrementado. La ecotoxicidad está dirigida en diferentes niveles incluyendo microorganismos, plantas, invertebrados y vertebrados. Investigaciones recientes indican que las NPs de ZnO y TiO₂, usadas en cremas bloqueadoras solares, son las que más contaminan cuerpos de agua. Sin embargo el efecto de estas partículas en el ambiente casi no se conoce. Las nanopartículas tienen un efecto ecotóxico, lo cual está dada por diferentes factores como la solubilidad y la especificidad de unión a un sitio biológico, lo cual ocasiona un cambio funcional y/o morfológico en los seres vivos.

Algunas propuestas tecnológicas se han planteado para remediar la contaminación de sistemas acuáticos; por ejemplo, el uso de plantas para contener, neutralizar o eliminar compuestos orgánicos y metales pesados. Pero el potencial del uso de plantas fitoremediadoras de NPs metálicas no se conoce.

En el Colegio de Postgraduados el grupo de microbiología, ha estudiado al helecho acuático *Azolla* en simbiosis con la cianobacterias *Anabaena azollae*, como un sistema de potencial fitoremediador de metales pesados (Hg, Cu, Zn, Cd) e hidrocarburos, pero el potencial de esta planta en la fitoremediación por contaminación de NPs metálicas no se conoce.

Por lo anterior en la presente investigación se evalúa el efecto del tamaño y la concentración de NPs de ZnO aplicadas a la solución nutritiva, en la fisiología de *Azolla filiculoides*, en sus respuestas de toxicidad y actividad antioxidante, así como los posibles mecanismos de acumulación en las frondas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Nanoestructurados y nanopartículas

Un material nanoestructurado es aquél cuyo tamaño es intermedio entre las estructuras moleculares y micrométricas; generalmente, estas estructuras experimentan efectos cuánticos que no son comunes en estructuras de mayor tamaño y tienen por tanto propiedades fisicoquímicas especiales (Rana y Kalaichelvan, 2013). El nanómetro es la diezmillonésima parte del metro (1×10^{-9} m), y los nanoestructurados tienen al menos una de sus dimensiones en la nanoescala (0.1-100 nm).

Existen varios criterios para clasificar a los nanoestructurados, pero en general, éstos pueden clasificarse en seis familias (Figura 1):

- a) **Nanotubos de carbono:** están formados solo de átomos de carbono con un arreglo en panal (hexágono y pentágono) y recibe el nombre de fullerenos; son muy ligeros, poseen alta dureza, elasticidad y conductividad eléctrica (Cerpa *et al.*, 2013).
- b) **Nanopartículas sólidas:** pueden estar formadas de un sólo elemento como oro o plata (Au y Ag), o de algún compuesto reactivo (TiO_2 , AlO_2 , Fe_3O_4 , Ca_2PO_4) (Grassian *et al.*, 2008).
- c) **Nanopartículas core-shell:** son partículas que poseen un núcleo con propiedades físicas y químicas diferentes a la cubierta, la cual puede unirse a moléculas biológicas (Calvo y Avilés, 2013).
- d) **Dendrimeros:** polímeros con numerosas ramas de dimensiones nanométricas, con funciones químicas específicas (Blanco *et al.*, 2011).
- e) **Nanocápsulas:** reservorio o cápsula polimérica, conteniendo el principio o material

activo en un núcleo sólido, o bien adsorbido en la pared polimérica de la nanocápsula.

- f) **Nanoesferas:** esferas matriciales formadas por macromoléculas naturales, lípidos o polímeros sintéticos, cuyo principio activo se encuentra disperso en la matriz; la cual puede albergar nanodominios (Blanco *et al.*, 2011).

Las nanopartículas (NPs) son materiales que al menos dos de sus dimensiones son menores a 100 nm. Las NPs presentan propiedades como alta razón superficie/volumen, lo cual resulta en un gran número de átomos en la superficie de manera que sus propiedades físicas, magnéticas, fotoeléctricas y térmicas se modifican (Zavaleta *et al.*, 2013).

2.2. Nanopartículas de ZnO y TiO₂

Las NPs de dióxido de titanio (TiO₂) y de óxido de zinc (ZnO) son utilizadas en la fabricación de protectores solares, por su capacidad de absorber la radiación UV; el TiO₂ absorbe luz UV entre 280-315 nm, y el ZnO a 315-400 nm, por lo que la combinación de ambos producen una protección UV de amplio espectro (Huang *et al.*, 2013).

El ZnO se considera como un semiconductor por lo que se utiliza como sensor fotovoltaico, sensor electrónico y transductor; los nanopolvos de ZnO se utilizan en productos como plástico para la conservación de alimentos, cerámica, vidrio de alta resistencia, cemento, caucho, lubricantes, pinturas, y pigmentos, y para la conservación de alimentos, en baterías, etc. (Ma *et al.*, 2013).

Ambas NPs tienen propiedades antisépticas, en forma de pasta como emoliente protector y astringente cutáneo, están indicados en quemaduras leves, raspones, eritrodermias y rozaduras

de pañal, además es componente común en cosméticos y protectores solares debido a su excelente absorción UV y propiedades reflexivas (Huang *et al.*, 2013).

Debido el extendido uso que tienen estas NPs, ha surgido la preocupación por el impacto que estos materiales puedan causar en el ambiente. La producción mundial de NPs, principalmente de TiO₂ y ZnO, se estima en 1000 ton en el 2003 (Borm *et al.*, 2006). Basado en estimaciones y cálculos recientes, el número de productos consumidos en los mercados conteniendo NPs o nanofibras excede las 1300 unidades, y esta suma está incrementando rápidamente (Love *et al.*, 2012). La producción y el uso generalizado de NPs, tanto en la industria como en los cosméticos, aumenta cada año, su liberación al ambiente involucra tres mecanismos de acción tóxica según Brunner *et al.* (2006):

- 1) Las partículas pueden liberar sustancias tóxicas en los medios de exposición.
- 2) Las interacciones superficiales con el medio pueden producir sustancias tóxicas, radicales libres o especies reactivas de oxígeno.
- 3) Las partículas o su superficie pueden interactuar directamente con los organismos y afectar negativamente procesos biológicos.

2.2.1 Principios de la toxicidad de nanopartículas de ZnO y TiO₂

La toxicidad de un metal está influenciada por factores como la solubilidad, la unión específica a un sitio biológico, y su forma. Los efectos tóxicos de un metal pesado es definido por cambios en la funcionalidad o cambios morfológicos en el cuerpo, producido por ingesta, inhalación, absorción o agente biológico (Panyala *et al.*, 2008).

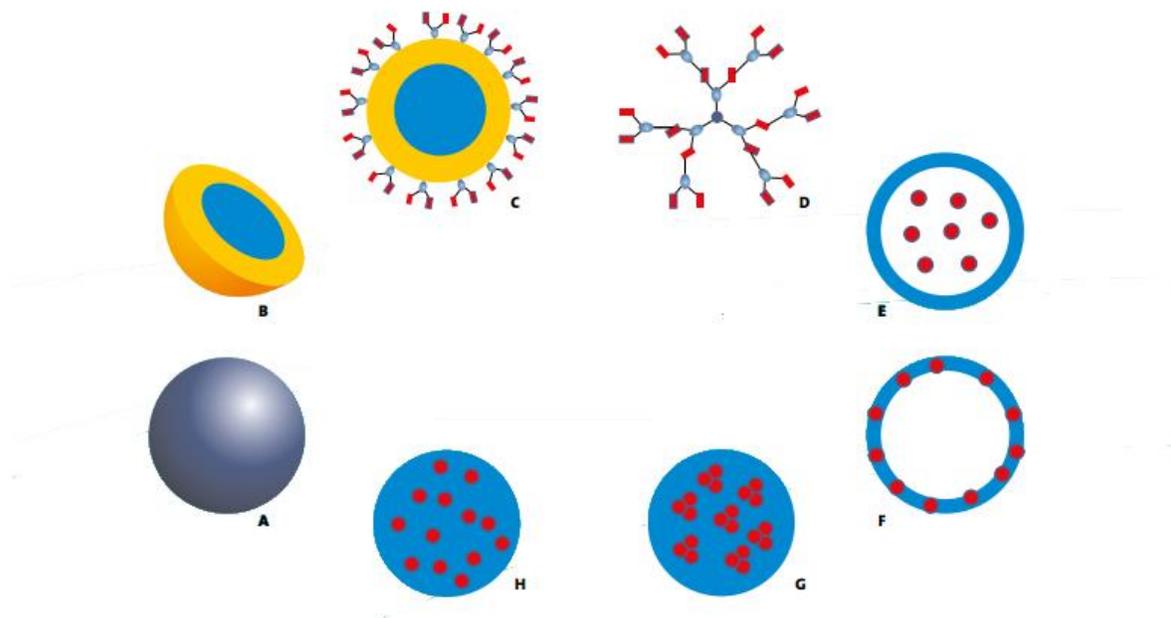


Figura 1. Nanoestructurados. A) nanopartícula metálica; B) nanopartícula core-shell; C) nanopartícula core-shell funcionalizada con moléculas biológicas; D) dendrímero; E) nanocápsula de núcleo líquido; F) nanocápsula con la sustancia activa adsorbida a la pared; G) nanoesfera con nanodominios; H) nanoesfera matricial con la sustancia activa dispersa (Zavaleta *et al.*, 2013).

La toxicidad de las NPs de ZnO sugiere varios mecanismos y modos de acción, como la disolución de NPs de ZnO a iones de Zn. La disolución depende de las propiedades fisicoquímicas del material (tamaño, área, composición química) y los parámetros ambientales (pH, temperatura, materia orgánica) de la exposición (Ma *et al.*, 2013). Borm *et al.* (2006) y Mudunkotuwa *et al.* (2012) sugieren que la velocidad de disolución de las NPs es controlada por el coeficiente de difusión del soluto, tipo de molécula, volumen de la solución, área de la superficie de la partícula, cuando el pH y la temperatura son fijos; así al reducir el tamaño de

partícula del soluto aumenta el área superficial y la tasa cinética de la disolución, con lo cual se espera un aumento en la solubilidad.

El pH es la condición que influye significativamente en la disolución de NPs de ZnO; la presencia de materia orgánica proporciona agentes quelantes para los iones, reduce la disolución y favorece la adsorción de la superficie de la partícula. En condiciones más ácidas, se favorece la disolución del ZnO; además, el aumento de temperatura también aumenta que la solubilidad de NPs de ZnO (Miao *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2012).

Se consideran dos características relevantes en la toxicidad de las NPs: 1) La solubilidad, ya que la disolución iónica contribuye a la toxicidad, y 2) la fotoreactividad, que causan toxicidad por fotoinducción (Ma *et al.*, 2013). La información sobre los efectos toxicológicos de las nanopartículas NPs es muy escasa. Gottschalk *et al.*, (2009) informó que las concentraciones de NPs de ZnO fueron aproximadamente 0.01 g L^{-1} en agua superficial y 0.432 g L^{-1} en las aguas residuales en Europa. Boxall *et al.* (2007) estimó la presencia de al menos 100 g L^{-1} de NPs de ZnO en aguas del Reino Unido. En este sentido, las actividades humanas ocasionan la introducción de varios centenares de miles de millones de toneladas por año de metales y nanopartículas en el ambiente. La actividad fotocatalítica de las NPs de ZnO y TiO_2 pueden ocasionar la generación de radicales libres, los cuales pueden dañar el ADN de los tejidos animales y vegetales (Sadrieh *et al.*, 2010).

2.2.2 Toxicidad de nanopartículas de ZnO en animales y microorganismos

La toxicología de las NPs de ZnO se ha evaluado en diferentes organismos como bacterias, invertebrados acuáticos, invertebrados terrestres y vertebrados acuáticos. Se ha demostrado la eficiencia bactericida de NPs de ZnO en bacterias patógenas y de relevancia ecológica como

E. coli, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacterias gram positivas como *S. aureus*, son más susceptibles a NPs de ZnO que bacterias gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Premanathan *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2013). Sin embargo, las bacterias son descomponedores de materia orgánica, y son base trófica de medios acuáticos y terrestres por lo que el impacto de las NPs en su medio puede tener alto impacto (Ma *et al.*, 2013).

En especies de crustáceos como *Daphnia magna* y *Thamnocephalus platyurus* se reportaron efectos tóxicos de NPs de ZnO, en forma soluble de ion Zn^{+} (Blinova *et al.*, 2010). En comparación con estudios a nanoescala (< 200 nm) y microescala (< 1000 nm) en *D. magna* se demostró que la toxicidad de las NPs de ZnO depende de su tamaño, cubierta y agregación de la partícula, así como la aplicación de los tratamientos de dispersión como se observó en *Corophium volutator* donde mostró efectos de supervivencia, crecimiento, reproducción con NPs de ZnO (35±10 nm) a 1 mg L⁻¹ (Fabrega *et al.*, 2011). En invertebrados terrestres como el nematodo *Caenorhabditis elegans* y gusano *Eisania fetida* se reportó baja toxicidad de las NPs de ZnO (1.5, 25 y 100 nm), en comparación con NPs ZnO de 30 nm las que mostraron alta toxicidad (Wang *et al.*, 2009). Los artrópodos *Heterocypris incongruens* y *Folsia candida* tuvieron 100 % de mortalidad con NPs de ZnO (< 100 nm) (Manzo *et al.*, 2011). En ambientes acuáticos las NPs de ZnO (20 y 30 nm) también tienen efectos tóxicos en el desarrollo embrionario del pez *Danio rerio*; en contraste, en *Cyprinus carpio* las NPs no tuvieron un efecto letal, pero causaron estrés oxidativo, disminución en las enzimas antioxidantes, y peroxidación de lípidos (Hao y Chen, 2012).

2.2.3 Toxicidad de nanopartículas ZnO en humanos

La toxicidad total anual de los metales movilizados por el hombre excede la toxicidad total de los residuos radioactivos y orgánicos generados cada año. Muchas especies metálicas son conocidas por sus efectos nocivos sobre la salud, y forman parte de la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (US EPA) como el cromo, mercurio, cobre, níquel, cadmio y otros (Nriagun, 1988). Los metales y las NPs están presentes en la superficie o en el interior de nuestro planeta como trazas, adsorbidos en el suelo, sedimentos y en partículas en suspensión, o disueltos como sales en sistemas acuosos (ríos, lagos, océanos y aguas subterráneas). También aparecen en barros y afluentes de diversas industrias (hidrometalúrgica), y de operaciones de lavado, enjuague y tratamientos superficiales en el metalizado de superficies o la fotografía (Figura 2).



Figura 2. Fuentes de nanopartículas en el ambiente (Smitha *et al.*, 2012; Ávalo *et al.*, 2013).

Además de la gran preocupación ambiental, la acumulación de residuos metálicos en afluentes representa pérdidas significativas en materias primas. A diferencia del caso de la destrucción de contaminantes orgánicos, la posibilidad de recuperación y reciclado de los metales ha sido un motor poderoso en los desarrollos de diferentes procedimientos (Baird, 1998). La duda sobre la seguridad de las NPs y su uso por instituciones públicas y privadas se enfoca a la posibilidad de su asociación al peligro de la deliberada e irresponsable producción. Una producción industrial masiva de NPs resulta en la generación de desechos liberados al ambiente, por lo que los humanos estamos expuestos al contacto por diferentes medios como la inhalación, contacto con la piel e ingesta (Abbott y Maynard, 2010; Maynard, 2007; Schulenburg, 2008).

Diversas pruebas de nanotoxicidad en humanos se han evaluado a través de sangre humana para determinar el efecto del tamaño y cambio en la superficie de NPs de poliestireno (20 y 220 nm) en la inducción de coagulación, trombocitos, activación de granulocitos; las nanopartículas de menor tamaño causaron la activación de trombocitos, granulocitos y hemólisis (Mayer *et al.*, 2009). En células epiteliales humanas (línea A599), se comparó la nanotoxicidad de NPs de CuO, TiO₂, ZnO, CuZnFeO₄, Fe₃O₄, Fe₂O₃ y nanotubos de carbono (MWCNT); en este estudio se observó daño en el ADN encontrándose que las NPs de CuO fueron las más tóxicas; provocaron lesiones oxidativas, redujeron la viabilidad celular, indujeron la peroxidación de lípidos, producción de glutatión, producción de superóxido dismutasa y catalasa; las NPs menos dañinas fueron las de Fe₃O₄, y de Fe₂O₃ (Strigul *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2008).

Estudios con líneas celulares epiteliales bronquiales de humanos con macrófagos (RAW 264.7 y BEAS-2B) demostraron que las NPs de CeO₂ (8 nm) actúan como antioxidante y

citoprotector; en contraste, las NPs de ZnO (13 nm) generan la producción de especies reactivas de oxígeno, estimulando la inflamación, y la muerte celular (Ahamed *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2008). En pruebas con ratones, Yang *et al.* (2005, 2009) determinaron toxicidad de los nanotubos de carbono y de NPs de SiO₂ y ZnO en células fibroblásticas de embrión, donde el daño oxidativo y la genotoxicidad está relacionada con el tamaño, forma y naturaleza química de los nanoestructurados. Las NPs de ZnO son las más tóxicas en comparación con SiO₂ y nanotubos de carbono (Mahmound *et al.*, 2010).

2.2.4 Toxicidad de nanopartículas de ZnO en plantas

Las plantas no están libres de la exposición a NPs. La ingeniería de nanomateriales ha ido en aumento por lo que la exposición directa, liberación accidental, contaminación de suelos o sedimentos y su liberación a la atmósfera son los principales factores de exposición a los que se enfrentan las plantas. Es poco el conocimiento que se tiene sobre el efecto de las NPs en las plantas cultivadas y sus efectos en la cadena alimenticia. En la literatura se sugiere que el modo de absorción, translocación y acumulación de las NPs en plantas depende de la especie de planta, así como el tamaño, tipo, composición química, funcionalización y estabilidad de las NPs (Rico *et al.*, 2011).

Las plantas son una fuente potencial de transporte de NPs, pero pueden promover una ruta de bioacumulación en la cadena alimenticia. Rico *et al.*, (2011) proponen un modelo de cómo podría ser la absorción, biotransformación y translocación de algunas NPs en plantas. Según estos investigadores, las NPs pueden entrar por las células mediante proteínas acarreadoras, acuaporinas, canales iónicos, y endocitosis por la creación de nuevos poros (Figura 3). Las NPs forman complejos con los transportadores de membrana o exudados de raíz y posteriormente son transportadas dentro de la planta; muchas NPs con base de metal, pasan a

la planta por el transporte de iones, también entra vía apoplasto o simplasto. Sin embargo, el mecanismo exacto es todavía desconocido (Figura 4). Lee *et al.* (2013) evaluaron los efectos fitotóxicos de NPs ZnO (44.46 ± 4.84 nm) en *Fagopyrum esculentum* se observó que el tamaño de la raíz y la biomasa disminuye con el aumento de concentraciones de NPs. Lin y Xing (2007, 2008) indican un efecto no negativo de NPs de ZnO [$< 10\text{mg L}^{-1}$ y $< 20\text{mg L}^{-1}$] en el crecimiento radicular de centeno, el aumento en la concentración estimula el sistema de defensa antioxidante.

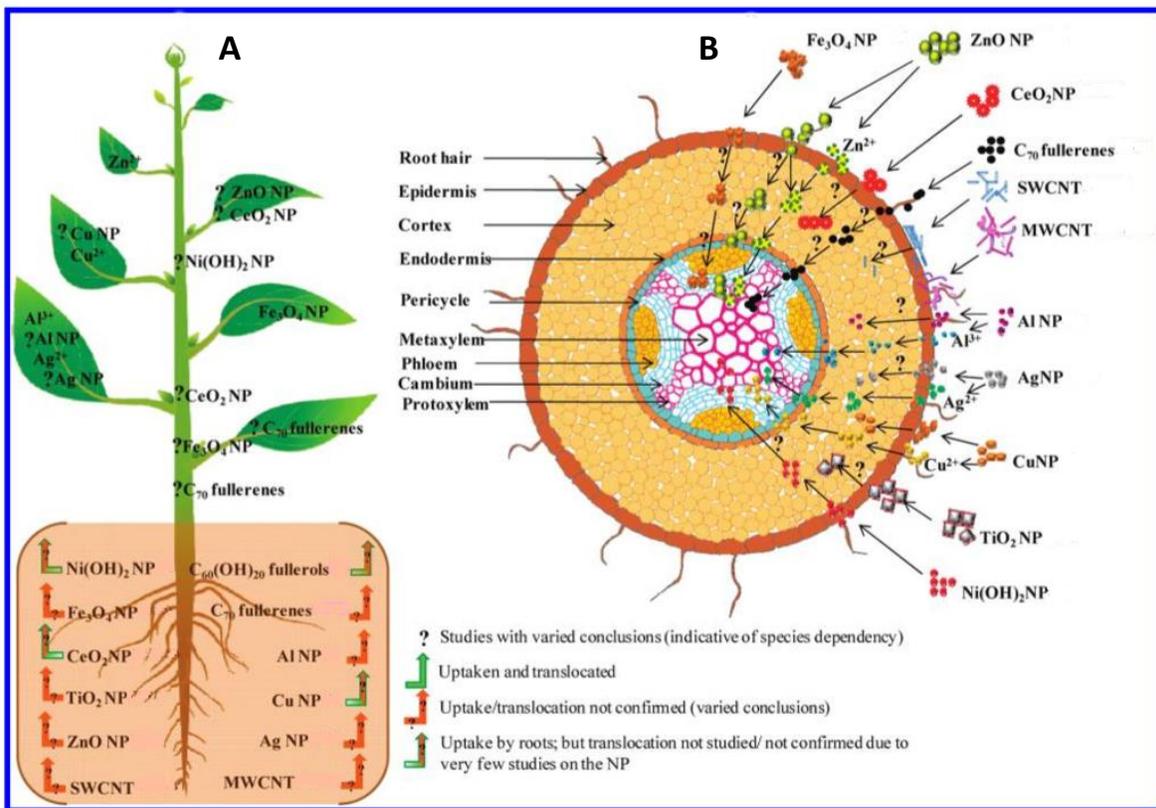


Figura 3. Rutas de absorción, translocación y biotransformación de varias nanopartículas en el sistema de la planta propuestas. A) Absorción y translocación selectiva de nanopartículas en la planta; B) corte transversal de la zona de absorción en raíz que muestra las diversas interacciones con nanopartículas a las que está expuesta la planta en el suelo (Rico *et al.*, 2011).

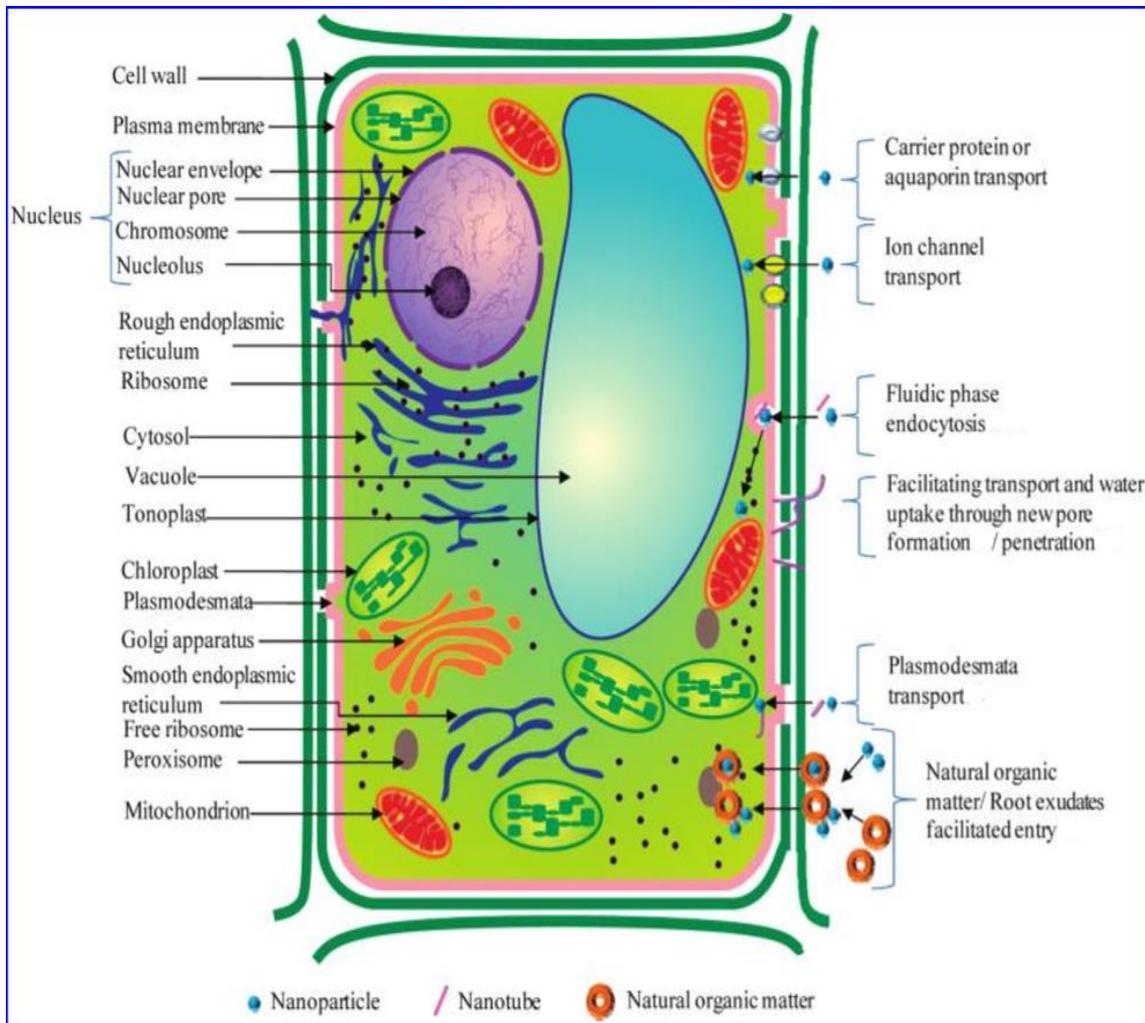


Figura 4. Posibles modos de absorción de nanopartículas en plantas (Rico *et al.*, 2011).

En especies como *Brassica napus*, *Raphanus sativus*, *Lolium perenne*, *Lactuca sativa*, *Zea mays* y *Cucumis sativus* se ha evaluado el efecto fitotóxico de NPs de ZnO, Zn⁺, Al₂O₃, Al y nanotubos de carbono (Lin *et al.*, 2007). Los nanotubos de carbono presentaron efectos tóxicos; las NPs de Al₂O₃ solo mostraron toxicidad en maíz, reduciendo la elongación. Las NPs con mayor efecto tóxico fueron ZnO y Zn⁺, las cuales redujeron la tasa de germinación, y limitaron el crecimiento de raíz y de la planta completa.

Contrariamente, algunos estudios reportan efectos positivos en el desarrollo y crecimiento de plantas a la exposición de nanomateriales. Kole *et al.* (2013) reportan efectos positivos en *Momordica charantia*, a la exposición de fulerenos (1.5 ± 0.2 nm y 5 ± 0.7 nm), con un aumento de 54% de la biomasa y 128% en rendimiento de fruta.

Las NPs pueden causar efectos de biotransformación y genotoxicidad en las plantas. Así López *et al.* (2010) demostraron efectos genotóxicos de NPs de ZnO (8 nm) y CeO₂ (7 nm) en soya (*Glycine max*); las concentraciones de NPs de ZnO a 4000 mg L⁻¹ se acumularon en los tejidos y afectaron la estabilidad del ADN, alterando el sistema antioxidante y la estabilidad del genoma.

Landa *et al.* (2012) evaluaron el efecto de NPs de ZnO (< 100 nm), TiO₂ y fulereno en raíz de *Arabidopsis thaliana*; la concentración de NPs a 100 mg L⁻¹ redujo el crecimiento y afecto la morfología de la planta. Las NPs de ZnO causaron estrés severo en la planta, afectando la transcripción de varios genes involucrados en respuestas por estrés osmótico, hídrico, oxidativo, aumentando la producción de proteínas involucradas en la detoxificación de iones metálicos.

2.3 Plantas acuáticas remediadoras de metales pesados

Las plantas acuáticas tienen potencial para reducir los contenidos de metales pesados. La absorción de un ion metálico depende de la cantidad de biomasa previa al tratamiento, es decir, depende del crecimiento de la planta y su producción de biomasa ante la aplicación del metal; al respecto, las plantas acuáticas presentan la ventaja de un rápido crecimiento (Rahmani y Sternberg, 1999).

Las macrofitas acuáticas *Pistia stratiotes* L., *Salvinia auriculata* Aubl., *S. minima* Baker y *Azolla filiculoides* Lam. demostraron su eficiencia para absorber metales pesados en aguas contaminadas; ante cadmio (3.5 mg L^{-1} y 10.5 mg L^{-1}) y plomo (25 y 125 mg L^{-1}), todas las macrofitas redujeron la cantidad de metal, siendo *P. stratiotes* la más eficiente al mostrar 10 veces más de Pb en raíces, y mostró mayor capacidad de rizofiltración de aguas contaminadas (Vesely *et al.*, 2011). Entre las especies acuáticas que han demostrado ser acumuladoras de arsénico se encuentran *Eichhornia crassipes*, *Lemna gibba*, *L. minor*, *Spirodela polyrhiza*, *Ipomea aquatica*, *Azolla caroliniana*, *A. pinnata*, *A. filiculoides*, *Pistia stratiotes*, *Hydrilla verticillata* y *Lepidium sativum* (Rahman y Hasegawa, 2011).

Azolla filiculoides es un helecho con capacidad de fijar nitrógeno, por su asociación con la cianobacteria *Anabaena azollae*, y su uso en suelos de cultivo de arroz beneficia su producción (Wagner, 1997). Además, esta asociación tiene la capacidad de acumular metales y compuestos tóxicos como mercurio, cadmio, cromo, cobre, níquel y zinc (Rai, 2008; Rai y Tripathi, 2009; Sánchez *et al.*, 2010; Bennicelli *et al.*, 2004; Arora y Saxena, 2005; Rakhshae *et al.*, 2006). El helecho acuático *Azolla filiculoides* es considerado un componente importante para la limpieza de superficies acuáticas contaminadas por compuestos orgánicos e inorgánicos. La exposición de *A. filiculoides* a concentraciones crecientes de Cr afectó significativamente el contenido de clorofila y compuestos fenólicos totales (Rai y Tripathi, 2009). En contraste, la exposición a bajas concentraciones de arsénico (5 y $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) estimuló el crecimiento de *A. filiculoides*, y la máxima acumulación ($28 \text{ } \mu\text{g}^{-1}$) en los tejidos se obtuvo con la exposición a $60 \text{ } \mu\text{g As mL}^{-1}$ (Sánchez *et al.*, 2011). Forni *et al.* (2012), mostraron que *Lemna minor* L. y *A. filiculoides* son tolerantes a la presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) ante 100 ppm y 10 ppm , respectivamente.

2.4 El simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae*

Las especies que pertenecen al subgénero *Azolla* son *A. filiculoides*, *A. caroliniana*, *A. microphylla* y *A. mexicana*, mientras que las pertenecientes al subgénero *Rhizosperma* son *A. pinnata* y *A. nilotica* (Evrard y Van Hove, 2004; Mosquera y Calderon, 2002; Carrapico, 2001). La ubicación taxonómica de *A. filiculoides* de acuerdo Smith *et al.* (2006) es:

Reino: Plantae

División: Moniliformopses

Clase: Polypodiopsida

Orden: Salviniiales

Familia: Azollaceae

Género: *Azolla*

Especie: *Azolla filiculoides* Lam.

Nombre común: Helecho de agua

Azolla filiculoides es un helecho acuático flotante que vive en muchos cuerpos de agua dulce, en un esporofito corto y ramificado que posee raíces cortas y simples de 0.5 a 2.5 cm de largo que cuelgan hacia abajo en el agua. El helecho flota en la superficie y cada fronda está ramificada con numerosas frondas pequeñas alternas, bilobuladas. Cada fronda presenta un lóbulo superior que contiene clorofila y un lóbulo inferior incoloro (Sánchez, 2011) (Figura 5 A y B). En el lóbulo dorsal de la hoja contiene a la cianobacteria *Anabaena azollae* la cual es un organismo fotosintético que habita como simbiote en las frondas de *Azolla* y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico (Figura 6).

La reproducción de *Azolla* puede ser asexual o vegetativa y sexual. La reproducción vegetativa ocurre por la fragmentación de ramas laterales que se separan del tallo principal, para formar una nueva planta (Espinoza y Gutiérrez, 2003). La reproducción sexual ocurre por la formación de esporas (gametocitos macho y hembra) que se desarrollan en el esporocarpio ubicado en el envés de las hojas. Las microesporas son de color verde o rojo, miden aproximadamente 2 mm de diámetro, y contienen numerosos microesporangios; son diminutas y tienden a formar pequeñas masas llamadas másulas. La microespora presenta un gloquidio que le permite adherirse y fertilizarse a las megasporas femeninas (Espinoza y Gutiérrez, 2003). *Azolla filiculoides* Lam. está ampliamente distribuida en regiones tropicales, subtropicales y templadas de América y Sudamérica, el noreste de Estados Unidos de América y Europa, Australia y Hawái (Moore, 1969).

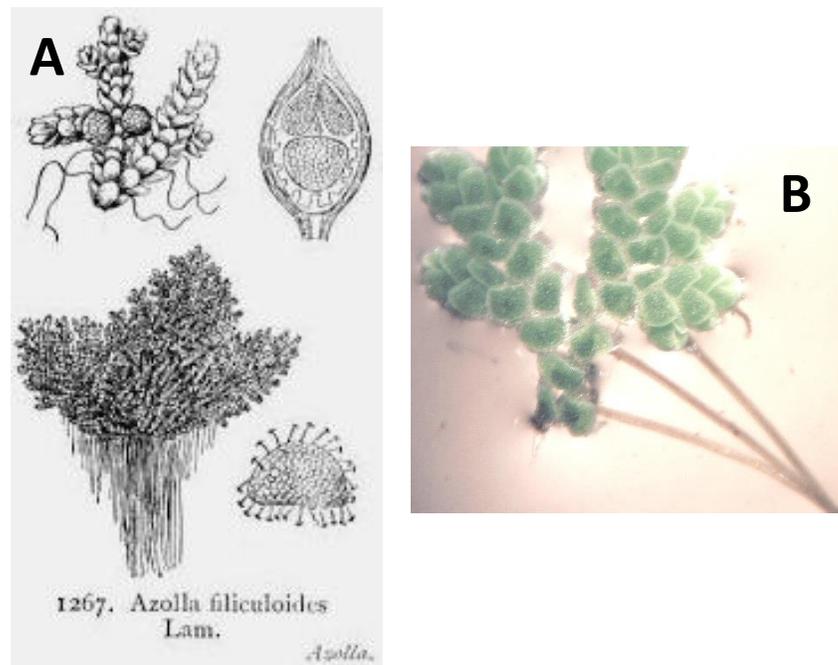


Figura 5. Helecho heterospórico acuático *Azolla filiculoides* Lam. A) Flora Británica, (1924); B) recolecta de Ensenada, Baja California, México (Sánchez, 2010).

Esta especie está distribuida en todo el mundo por su uso en la desintoxicación de medios acuáticos contaminados con metales pesados (Sculthorpe, 1967). Se encuentra en altitudes desde los 50 msnm en zonas lacustres o pantanosas, hasta los 3000 m.s.n.m. según los registros MEXU, 2013 (Figura 7).

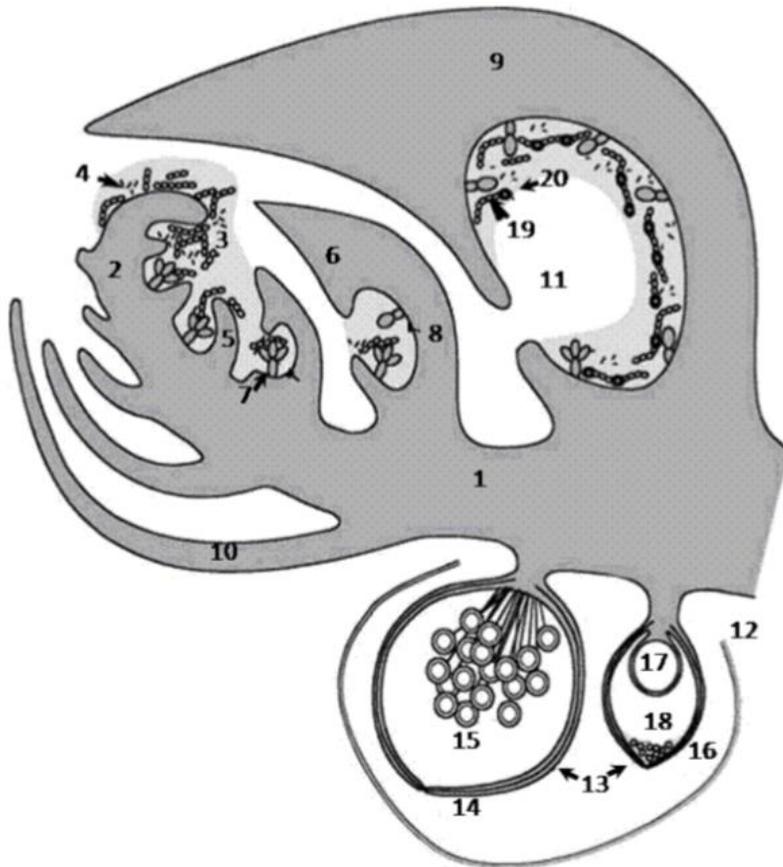


Figura 6. Corte longitudinal de *Azolla* y *Anabaena* 1) Tallo; 2) Ápice del tallo; 3) Colonia apical de *Anabaena* sin heterocistos; 4. Otras bacterias; 5. Primordio foliar; 6. Hoja joven, 7. Filamento pluricelular ramificado; 8. Filamento simple bicelular; 9. Lóbulo hoja superior. 10. Lóbulo hoja inferior; 11. Cavidad de la hoja; 12. Megasporocarpo; 13. Indusia; 14. Esporocarpo; 15. Microsporangia; 16. Microesporocarpo; 17. Microsporangio; 18. Acinetes de *Anabaena*; 19. Células vegetativas de *Anabaena*; 20. Heterocisto (Modificado de Van-Hove, 1989; Sánchez, 2011).



Figura 7. Mapa de distribución de *Azolla filiculoides* en México, según los registros del Herbario MEXU, Instituto de Biología, UNAM (elaboración propia, 2015).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo general

El objetivo fue evaluar la respuesta fisiológica de *Azolla filiculoides* Lam. a la exposición de NPs ZnO de dos tamaños diferentes.

3.1.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de dos tamaños de NPs ZnO en el crecimiento de *A. filiculoides*.
2. Evaluar el efecto de dos tamaños de NPs de ZnO en los pigmentos fotosintéticos y eficiencia del fotosistema II de *A. filiculoides*.
3. Evaluar el efecto de dos tamaños de NPs de óxido de zinc en la producción de moléculas antioxidantes y compuestos fenólicos de *A. filiculoides*.
4. Evaluar la actividad nitrogenasa de *A. filiculoides* a la exposición de NPs de óxido de zinc de dos tamaños diferentes.
5. Estudiar la localización de NPs ZnO en la planta, mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) acoplada a Microscopía Electrónica de Barrido.

3.2 Hipótesis

3.2.1 Hipótesis general

La presencia de NPs ZnO en el medio de cultivo, modifica la respuesta fisiológica de *Azolla filiculoides* Lam. en función del tamaño de la NPs.

3.2.2. Hipótesis particulares

1. Las NPs ZNO reducen el crecimiento de *A. filiculoides* dependiendo del tamaño de la partícula.
2. La concentración de pigmentos fotosintéticos y la eficiencia del fotosistema II de *A. filiculoides* se modifica en presencia de las NPs de ZnO de diferentes tamaños.
3. La actividad antioxidante total y fenoles totales de *A. filiculoides* aumentarán en presencia de NPs ZnO, dependiendo el tamaño, como respuesta al estrés.
4. Las NPs ZnO reducirán la actividad nitrogenasa del simbiosistema *A. filiculoides*-*Anabaena azollae* independientemente del tamaño de la partícula.
5. La NPs ZnO grandes se acumularán en la parte externa de la planta y las NPs pequeñas se acumularán predominantemente en la parte interna de las hojas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Caracterización de las nanopartículas de ZnO

Se usaron NPs de óxido de zinc de dos procedencias y tamaños diferentes: a) NPs de ZnO de grado analítico suspendidas en butilglicol 40% (Sigma-Aldrich, USA), y b) NPs de ZnO grado farmacéutico, en polvo ("Farmacia Paris", México). Las NPs de grado analítico en suspensión de butilglicol al 40% se lavaron para eliminar el butilglicol. Una alícuota de 1 mL de la suspensión se centrifugó a 17000 g por 20 min. y luego se eliminó el sobrenadante (butilglicol). El pellet (NPs) se resuspendió en agua desionizada, y luego se centrifugó a 17000 g por 20 min. Este procedimiento se repitió dos veces. Las NPs de ZnO libres de butilglicol y las muestras secas de NPs de ZnO de grado farmacéutico, se diluyeron 1:100 en agua desionizada y se agitaron en un ultrasonicador (Branson®) por 10 min. Posteriormente 20 µL de la suspensión se montaron en rejillas de cobre de 200 orificios cubiertas con Formvar y carbón. Dos rejillas de cada tipo de partícula se observaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) (Tecnai 2 Spirit, Fei Company, Holanda) operando a 120 Kv. Se obtuvieron 5 micrografías de cada tipo de NPs (Sigma Aldrich y Farmacia Paris) de las cuales se calculó el tamaño promedio con un procesador de imágenes TIA (Tencai. Imaging & Analysis) version 4.7 SP3 (1994-2014).

4.2 Material biológico y establecimiento de *A. filiculoides*

Las plantas de *Azolla filiculoides* se obtuvieron del solarío del área de Microbiología del Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, campus Montecillo (19.52°N, 98.88°O a 2.250 m.s.n.m.)

Con la finalidad de determinar el peso adecuado del helecho a usar, se colocaron 0.5, 1 y 2 g de *Azolla filiculoides* en charolas de 250 mL con solución nutritiva Yoshida pH 5,5 (Yoshida *et al.*, 1971) (Cuadro 1). Las charolas (12 x 6.5 x 4 cm) se colocaron en invernadero con temperatura promedio diurna de 26°C y nocturna de 19°C, por 6 días. Se midió la tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación para determinar el peso de planta más adecuado a usar en el experimento.

Cuadro 1. Solución nutritiva Yoshida (Yoshida *et al.*, 1971).

Macronutrientes*	mM	g 1000 mL ⁻¹	Micronutrientes**	μM	g 100 mL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1.43		FeCl ₃	35.6	7.70
CaCl ₂	1.00	88.60	MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.5	1.5
MgSO ₄	1.64	324.0	CuSO ₄	2.0	0.031
K ₂ SO ₄	1.32	71.40	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.075	0.074
NaH ₂ PO ₄	0.32	40.30	H ₃ BO ₃	1.9	0.934
Ácido Cítrico		11.90	ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0.035

*Se emplean 6.25 mL de c/u por cada 5 L

**Aforar todas las soluciones a 1 L con ácido sulfúrico

4.3 Diseño experimental, tratamientos y variables

El diseño experimental fue completamente al azar con un testigo y seis tratamientos, con dos tamaños de NPs de óxido de zinc y tres concentraciones:

T1: 0 mg ·L⁻¹ de NPs de ZnO (testigo)

T2: 100 mg ·L⁻¹ de NPs de 26.7 ± 1 nm (Sigma Aldrich)

T3: 200 mg ·L⁻¹ de NPs de 26.7 ± 1 nm (Sigma Aldrich)

T4: 400 mg ·L⁻¹ de NPs de 26.7 ± 1 nm (Sigma Aldrich)

T5: 100 mg ·L⁻¹ de NPs de 238 ± 30.7 nm (farmacia)

T6: 200 mg ·L⁻¹ de NPs de 238 ± 30.7 nm (farmacia)

T7: 400 mg ·L⁻¹ de NPs de 238 ± 30.7 nm (farmacia)

Las NPs de ZnO se agregaron a la solución Yoshida y la suspensión fue tratada con un ultrasonicador Branson® (50Hz) por 10 min. Se colocaron charolas de 200 ml con 1g de peso fresco de planta con 5 repeticiones por tratamiento por un período de 6 días, y cada experimento se realizó por triplicado.

Las variables analizadas, fueron las siguientes: tasa relativa de crecimiento; tasa de duplicación; concentración pigmentos fotosintéticos; fluorescencia de clorofila; actividad antioxidante total; compuestos fenólicos totales y actividad nitrogenasa.

4.4 Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación.

Tasa relativa de crecimiento:

$$\text{Tasa relativa de crecimiento (TRC)} = \frac{\ln(\text{pi}) - \ln(\text{pf})}{t}$$

Y la tasa de duplicación:

$$\text{TD} = \frac{t}{\text{TRC}}$$

Donde:

Ln (pi): Logaritmo natural del peso inicial (g)

Ln (pf): Logaritmo natural del peso final (g)

t: tiempo de incubación (días)

4.5 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y xantofilas + carotenoides se cuantificó según Lichtenthaler y Wellburn, (1983).

$$\text{Chla} = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Chlb} = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$x+c = 1000 A_{470} - 3.27 \text{ Chla} - 104 \text{ Chlb}/229$$

Chla: clorofila a; Chlb: clorofila b; x+c: xantofilas y carotenos

Frondas de helecho (0.15-0.2 g) se maceraron en 5 mL de acetona al 80%. Las muestras se centrifugaron (Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific, USA) por 10 min a 4000 g, y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro (Genesys 100v Thermo electro) a las absorbancias de 470, 663, 646 nm. La concentración de cada pigmento se calculó con la fórmula propuesta por Lichtenthaler y Wellburn, y se expresó en $\mu\text{g Chl mg PF}^{-1}$.

4.6 Fluorescencia de la clorofila

La eficiencia del fotosistema II (PSII) es una medición que permite evaluar el transporte de electrones entre el PSII y PSI y se mide a través de la fluorescencia de clorofila, la cual se midió en frondas de *A. filiculoides* con un fluorómetro portátil (OS-30p + Chlorophyll Fluorometer, USA). Las frondas fueron seleccionadas al azar, para tener una área de 4 mm² de tejido foliar que fue iluminada con un pico de emisión de 650 nm de longitud de onda con 6 LEDs (diodos emisores de luz roja) montados en el soporte cilíndrico del sensor del fluorómetro. Primero se indujo la oxidación completa de los centros de reacción, también llamado periodo de adaptación, colocando las frondas en obscuridad durante 5 min. La

eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema II (Fv/Fm) se calculó por el método de Küpper *et al.* (2002).

4.7 Actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total se determinó por el ensayo de decoloración radical 1,1-difenil-2-picryldrazyl (DPPH) (Matthäus, 2002). La extracción se obtuvo de 150-200 mg de peso fresco de *A. filiculoides* con 1 mL de metanol 80% a 4°C. Los extractos se centrifugaron a 17000 g, durante 15 min. Se usó una mezcla de reacción de 30 µL del extracto añadido con 235 µL de solución de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) en microplacas. Se tomaron lecturas iniciales de absorbancia a 515 nm, y finales después de 15 min con un espectrofotómetro (Synergy 2 Biotek® Instruments, USA). La actividad antioxidante se calculó mediante la aplicación de alícuotas de Trolox y concentraciones conocidas de solución, compuesto cristalino con radicales libres estables y conocido como trampa de radicales libres. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de tejido fresco ($\mu\text{M Trolox g}^{-1}$).

4.8 Compuestos fenólicos solubles totales

El contenido de compuestos fenólicos solubles totales se evaluó por el ensayo del reactivo Folin-Ciocalteu utilizando ácido clorogénico como estándar (Swain & Hills, 1959). Un peso de 150-200 mg de fronda fresca se maceró con 1 mL de metanol (80%) a 4°C, y se centrifugó a 17000 g, por 15 min. Se colocaron 30 µL del extracto más 90 µL de Na₂CO₃ y 150 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu en microplacas. Treinta min después de haber hecho la mezcla, se midió la absorbancia a 725 nm con un espectrofotómetro (Synergy 2 Biotek® Instruments, Inc. Winooski, Vermont).

4.9 Actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa en *A. filiculoides* se evaluó indirectamente mediante la cuantificación de la concentración de etileno. El material vegetal fresco (1 g) se colocó en frascos de 1L con 200 mL de solución Yoshida y fue sellado herméticamente con cinta teflón. Se extrajo el 10% del aire del frasco y se sustituyó con un volumen equivalente de gas acetileno, y se dejó incubar por 2 h. Luego se extrajeron del frasco, 5mL del gas, y se colocaron en tubos vacutainer para su análisis mediante cromatografía de gases (HP Chrompack 5890 Series II, con estándar de etileno (20 mL). Los resultados se expresaron en μmol de etileno g^{-1} de *A. filiculoides*.

4.10 Microanálisis de Zn mediante EDS-MEB

El análisis EDS permite identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra. Las frondas secas de *A. filiculoides* se colocaron sobre portamuestras de latón con cinta doble adhesiva de cobre y fueron recubiertas con oro. La presencia de Zn fue detectada mediante espectroscopía de energía dispersa de rayos X (EDS en INCA x-ACT, Oxford Instruments, UK) acoplada a un Microscopio Electrónico de Barrido (Jeol JSM- 6390). Cada elemento tiene una longitud de onda característica y puede ser identificado por ésta obteniendo el porcentaje de cada elemento en la planta.

4.11 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Sistem, Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002). Los valores de cada variable se expresaron como promedios \pm error estándar.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de nanopartículas ZnO

Según las observaciones con MET las NPs de ZnO grado analítico Sigma-Aldrich fueron partículas de superficie lisa, pequeñas de 26.7 ± 1 nm, y el tamaño más frecuente fue de 20-30 nm (Cuadro 1; Figura 8). La forma de las partículas fue isodiamétrica, de caras regulares. El índice de redondez calculado como diámetro mayor entre diámetro menor, indicó un valor de 1.09 ± 0.058 , valor cercano a 1, lo que indica una forma cercana a un poliedro regular, casi esférica (Cuadro 2).

Las NPs de ZnO de grado farmacéutico fueron de superficie lisa, con un tamaño promedio de 238 ± 30.7 nm, y el tamaño más frecuente fue de 200-300 nm (Cuadro 2; Figura 8). La forma de las partículas fue alargada, con un índice de redondez (3.2 ± 0.54), lo que indica que al menos una de sus dimensiones es tres veces mayor que la dimensión menor, confirmando su forma alargada. Estos datos confirman diferencias en tamaño y forma de los dos grupos de partículas usadas (Cuadro 2). En la presente investigación se denominarán “NPs pequeñas” a las de procedencia Sigma Aldrich y “NPs grandes” a las de procedencia Farmacia Paris.

Cuadro 2. Tamaño en índice de redondez de NPs de ZnO de dos procedencias.

Procedencia de las NPs	Tamaño (nm)	Índice de redondez
Sigma - Aldrich grado analítico	26.7 ± 1.0	1.09 ± 0.058
Farmacia París grado farmacéutico	238 ± 30.7*	3.2 ± 0.54*

Los datos de tamaño son media ± error estándar, n=80. (*) Diferencias significativas entre procedencias según (Tukey $p \leq 0.05$)

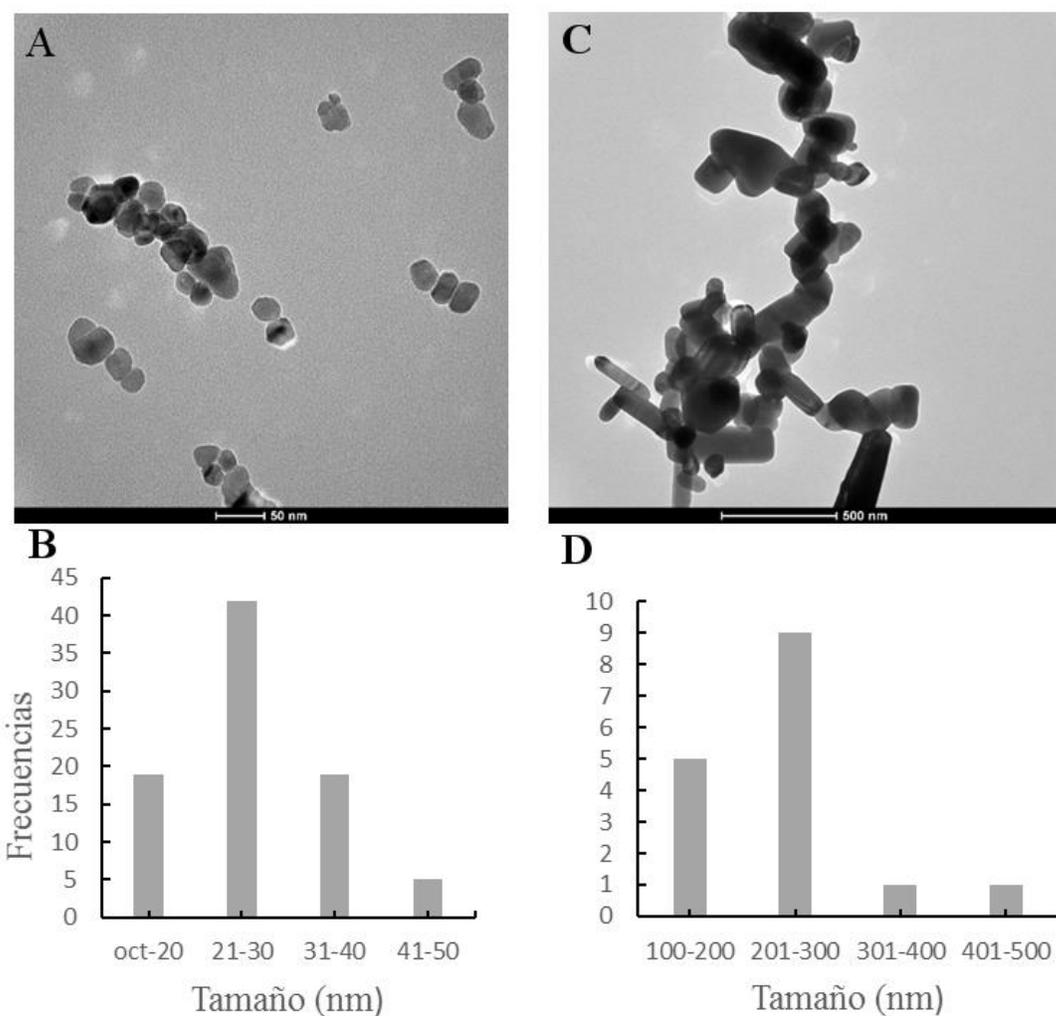


Figura 8. Análisis de morfología, tamaño y frecuencias de NPs de ZnO con Microscopía Electrónica de Transmisión. A) y B) NPs grado analítico (Sigma-Aldrich); C) y D) NPs grado farmacéutico; A) y C) micrografías electrónicas que muestran la morfología de NPs; B) y D) frecuencias de intervalos de tamaños. Tamaños promedio de NPs de grado analítico y de grado farmacéutico en cinco micrografías; n= 80.

5.2 Establecimiento de *Azolla filiculoides* Lam.

Los resultados de crecimiento del helecho mostraron diferencias entre los tratamientos (Cuadro 3). La tasa relativa de crecimiento (TRC) y la tasa de duplicación (TD) fueron mayores en los tratamientos con 1 o con 2 g; en comparación con los tratamientos con 0.5 g de biomasa del helecho. Con base en estos resultados, los experimentos de toxicidad de NPs ZnO se realizaron usando 1 g de planta en las charolas descritas en la sección de materiales y métodos.

Cuadro 3. Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación de *A. filiculoides* después de 6 días de crecimiento a 19-23 °C.

Tratamientos (g)	TRC (g · g · día ⁻¹)	TD (día)
0.5	0.88 ± 0.147 b	1.3 ± 2.3 a
1	1.6 ± 0.06 ab	8.2 ± 0.77 ab
2	1.3 ± 0.14 a	6.9 ± 0.26 b

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (0.5, 1 y 2 g), Medias ± error estándar, n=3 (Tukey, $p \leq 0.05$).

5.3 Efecto de NPs ZnO en el crecimiento de *Azolla filiculoides*

El crecimiento de *A. filiculoides* fue afectado a la mayor concentración de NPs (400 mg L⁻¹), mostrando una reducción en la TD con respecto al testigo, en los dos tamaños de partículas. Sin embargo, el tamaño menor de NPs (26.7±1 nm) redujo la TD, ante 100 y 400 mg L⁻¹ de NPs. Las concentraciones de las NPs no mostraron diferencias significativas entre los tamaños, pequeñas y grandes, y tampoco con respecto al testigo, en la TRC (Figura 9).

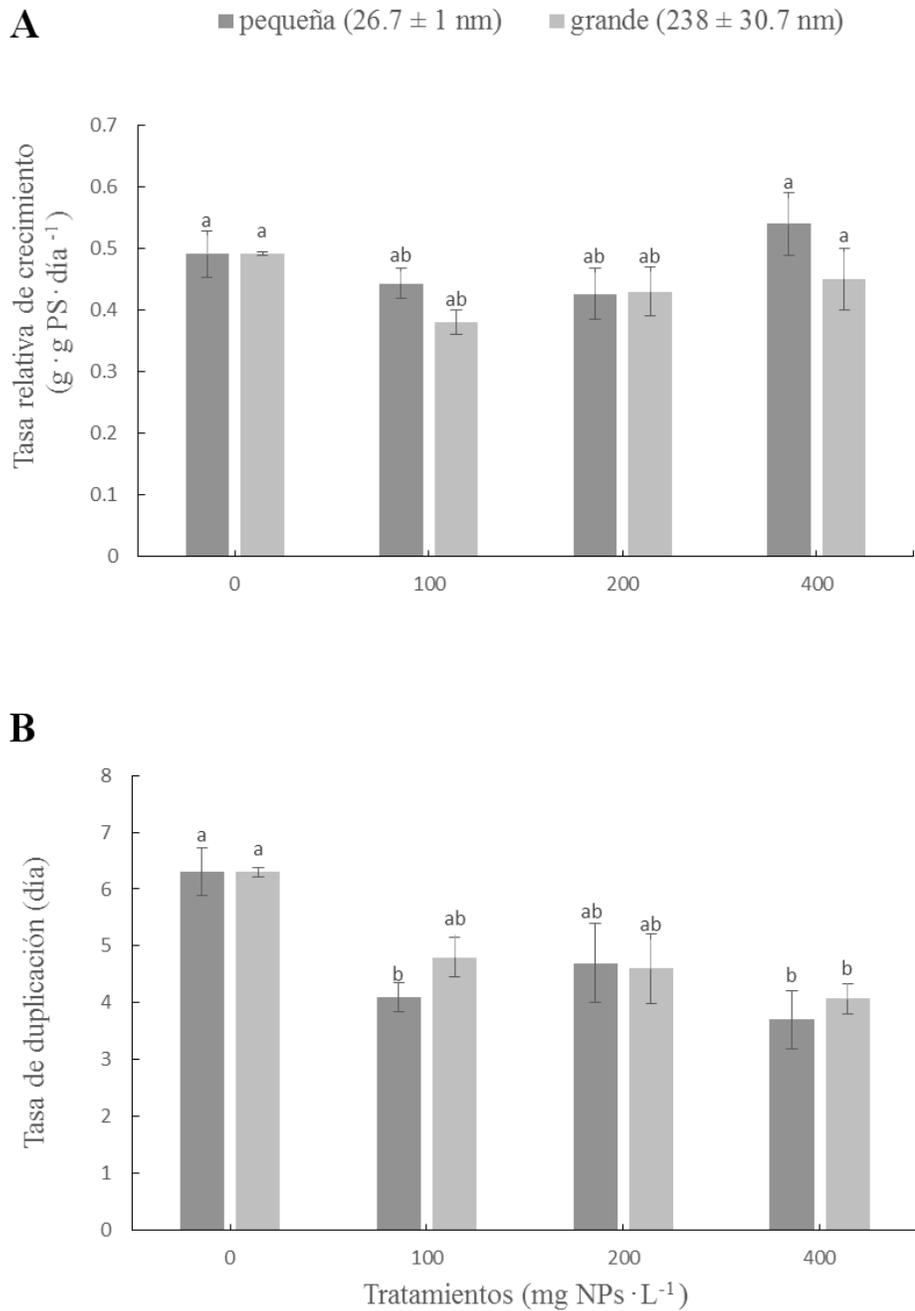


Figura 9. Análisis de crecimiento de *A. filiculoides* expuesta a tres concentraciones de NPs, durante 6 días. A) Tasa relativa de crecimiento (TRC); B) tasa de duplicación (TD). Media \pm error estándar; n=9. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PS: peso seco.

5.4 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Las concentraciones de clorofila (Chl) total, Chla, Chlb, y c+x en *A. filiculoides* se vieron afectados significativamente ($p \leq 0.05$) por efecto del incremento de las concentraciones de las NPs (Figura 10; Cuadro 4). Las NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm) redujeron significativamente los niveles de Chla y Chlb, pero no la concentración de c+x, con respecto al testigo. En contraste, las NPs grandes (238 ± 30.7 nm) no presentaron reducción en las concentraciones de estos pigmentos. El aumento en la concentración de las NPs disminuyó los pigmentos fotosintéticos en presencia de NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm).

La concentración de las NPs a 400 mg L^{-1} redujo significativamente la cantidad de pigmentos totales en comparación con el testigo. Las NPs grandes de ZnO (238 ± 30.7) también afectaron el contenido de pigmentos fotosintéticos al aumentar su concentración en la solución nutritiva; sin embargo, no hubo diferencias entre tratamientos (Figura 10B).

5.5 Fluorescencia de clorofila

En general, el rendimiento de PSII (F_v / F_m) de *A. filiculoides* se redujo en presencia de las NPs, pero este efecto no se magnificó al aumentar su concentración. El análisis estadístico indicó diferencias ($p \leq 0.05$) significativas entre los tamaños de NPs (Cuadros 6 y 7). Las NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm) promovieron una reducción significativa del F_v/F_m en comparación con NPs grandes (238 ± 30.7 nm), especialmente en la concentración de 100 mg L^{-1} . Al aumentar las concentraciones de NPs, el helecho presentó menor fluorescencia de clorofila en comparación con el testigo. Sin embargo, en las concentraciones de 200 y 400 mg L^{-1} no hubo diferencias significativas por efecto del tamaño de partículas (Figura 11).

Cuadro 4. Efecto del tamaño de partícula en pigmentos fotosintéticos de *Azolla filiculoides* a los 6 días de exposición a tres concentraciones (100, 200, y 400 mg L⁻¹) de NPs de ZnO

Tamaño NPs	Chla	Chlb	c+x	Chl total
(nm)	(mg·g ⁻¹ PF)	(mg·g ⁻¹ PF)	(mg·g ⁻¹ PF)	(mg·g ⁻¹ PF)
Pequeña (26.7 ± 1)	0.1451 ± 0.0078 b	0.0341 ± 0.0020 b	0.0561 ± 0.0026 b	0.1792 ± 0.0095 b
Grande (238 ± 30.7)	0.2067 ± 0.0108 a	0.1209 ± 0.0027 a	0.0793 ± 0.0023 a	0.3518 ± 0.0087 a

Datos son media ± error estándar; n = 9. Letras distintas entre concentraciones indican diferencias significativas, (Tukey $p \leq 0.05$).

Cuadro 5. Efecto de concentración de NPs de ZnO en pigmentos fotosintéticos de *Azolla filiculoides* a los 6 días de exposición con partículas pequeñas (26.7 ± 1.0 nm) y grandes (238 ± 30.7 nm).

Concentración de NPs (mg NPs · L ⁻¹)	Chla (mg · g ⁻¹ PF)	Chlb (mg · g ⁻¹ PF)	c+x (mg · g ⁻¹ PF)	Chl total (mg · g ⁻¹ PF)
0	0.2056 ± 0.0062 a	0.0774 ± 0.0074 ab	0.0745 ± 0.0024 a	0.2831 ± 0.0092 a
100	0.1958 ± 0.0133 a	0.0788 ± 0.0118 ab	0.0709 ± .0044 a	0.2756 ± 0.0252 a
200	0.1953 ± 0.019 a	0.0851 ± 0.0134 a	0.069 ± 0.0056 a	0.279 ± 0.0319 a
400	0.1086 ± 0.0017 b	0.0688 ± 0.0103 b	0.0564 ± 0.0038 b	0.2243 ± 0.0236 b

Medias ± error estándar; n = 9. Letras distintas entre concentraciones indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

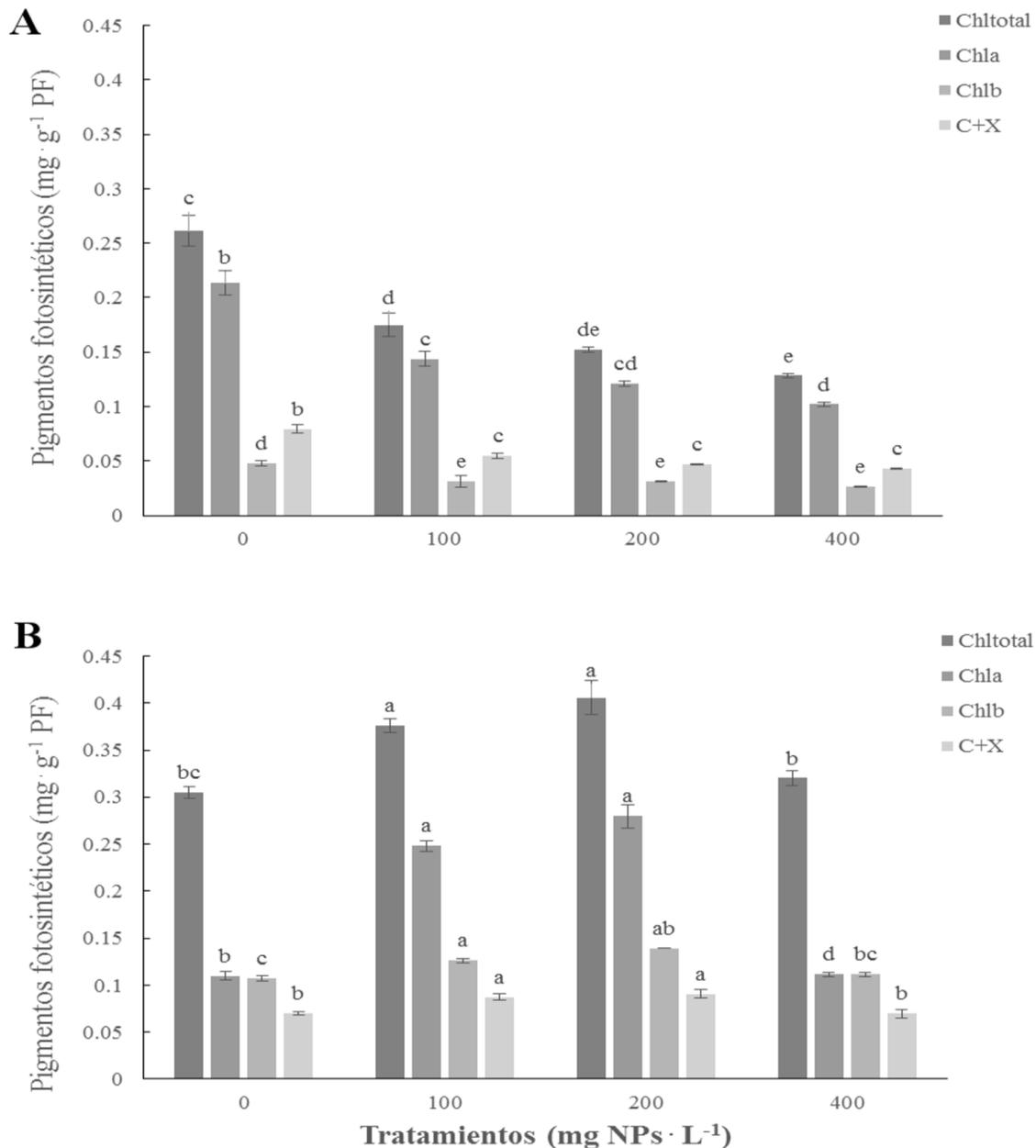


Figura 10. Contenido de pigmentos fotosintéticos en *Azolla filiculoides* a los 6 d de exposición a cuatro concentraciones de NPs de ZnO. A) NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm); B) NPs grandes (238 ± 30.7 nm). Media \pm error estándar; n=9. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo pigmento (Tukey $p \leq 0.05$); PF: peso fresco.

Cuadro 6. Efecto del tamaño de NPs de ZnO en la fluorescencia del fotosistema II de *Azolla filiculoides*.

Tamaño NPs (nm)	Fluorescencia (Fv/Fm)
Pequeña (26.7 ± 1)	0.6207 ± 0.008 b
Grande (238 ± 30.7)	0.6418 ± 0.007 a

Letras distintas indican diferencias significativas entre tamaños de NPs (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 7. Efecto de las concentraciones de NPs de ZnO en la fluorescencia del fotosistema II en *Azolla filiculoides*.

Concentración de NPs (mg NPs · L ⁻¹)	Fluorescencia (Fv/Fm)
0	0.682 ± 0.005 a
100	0.613 ± 0.011 b
200	0.604 ± 0.007 b
400	0.625 ± 0.009 b

Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones (Tukey, $p \leq 0.05$).

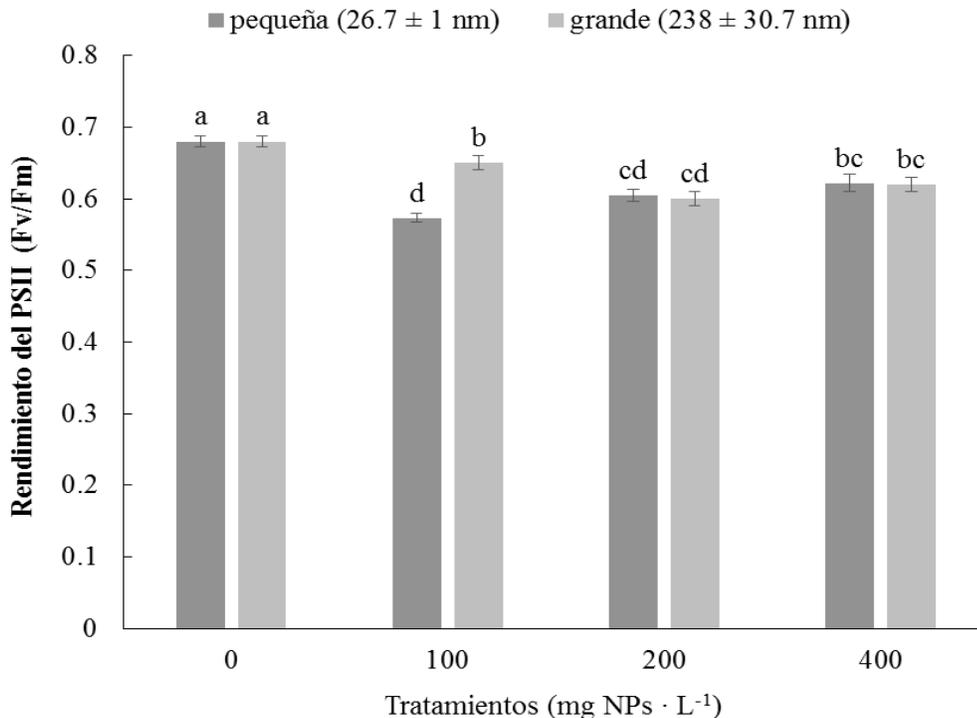


Figura 11. Rendimiento fotoquímico máximo del PSII de *Azolla filiculoides* expuesta a NPs de ZnO pequeñas (26.7 ±1 nm) y grandes (238 ± 30.7 nm) expuestas durante 6 d. Media ± error estándar, n=9. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$).

5.6 Actividad antioxidante total

La respuesta de la actividad antioxidante de *A. filiculoides* a la presencia de NPs pequeñas (26.7±1 nm) y grandes (238±30.7 nm) mostró diferencias significativas ante 400 mg L⁻¹ (Cuadros 8 y 9). Las NPs pequeñas disminuyeron la actividad antioxidante total en 60 % con respecto al testigo; en comparación con el 40% de aumento observado con las NPs grandes. En los tratamientos con NPs pequeñas (26.7±1 nm) se observó menor actividad antioxidante en comparación con las NPs grandes (238±30.7 nm) (Figura 12).

Cuadro 8. Respuesta de actividad antioxidante total en *Azolla filiculoides* ante la presencia de NPs de ZnO de dos tamaños diferentes.

Tamaño NPs (nm)	Actividad antioxidante total ($\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$)
Pequeña (26.7 ± 1)	1633.2 ± 112.2 b
Grande (238 ± 30.7)	2451.8 ± 207.1 a

Letras distintas indican diferencias significativas entre tamaño de NPs (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 9. Efecto de concentración de NPs de ZnO en la respuesta de actividad antioxidante total de *Azolla filiculoides*.

Concentración de NPs ($\text{mg NPs} \cdot \text{L}^{-1}$)	Actividad antioxidante total ($\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$)
0	2077.8 ± 131.7 a
100	2102.2 ± 280.8 a
200	1851.9 ± 144.8 a
400	2138.0 ± 384.5 a

Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones (Tukey, $p \leq 0.05$).

5.7. Compuestos fenólicos solubles totales

Azolla filiculoides acumuló mayor cantidad de compuestos fenólicos solubles totales (40 %) ante la exposición de 400 mgL⁻¹ de NPs grandes (238±30.7 nm), con respecto al testigo, y a los tratamientos de 100 y 200 mg L⁻¹. En contraste, la exposición a NPs pequeñas (26.7±1 nm) a 400 mg L⁻¹ redujo en 60% los compuestos fenólicos totales con respecto al testigo (Figura 13).

La tendencia general, respecto al tamaño de partícula, fue una reducción en los compuestos fenólicos totales causada por la exposición a NPs pequeñas en comparación con las grandes (Cuadro 10). Los niveles de fenoles totales en *A. filiculoides* no fueron diferentes estadísticamente entre las concentraciones probadas (Cuadro 11).

Cuadro 10. Efecto del tamaño de NPs de ZnO en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales de frondas de *Azolla filiculoides*.

Tamaño NPs (nm)	Compuestos fenólicos (µg· g ⁻¹ PF)
Pequeña (26.6 ± 1)	404.7 ± 22.9 b
Grande (268.6 ± 30)	542.3 ± 19.4 a

Letras distintas entre tamaños de NPs indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 11. Efecto de la concentración de NPs de ZnO en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales de frondas de *Azolla filiculoides*

Concentración de NPs (mg NPs · L ⁻¹)	Compuestos fenólicos (µg · g ⁻¹ PF)
0	503.1 ± 14.9 a
100	480.5 ± 15.3 a
200	461.2 ± 27.8 a
400	449.0 ± 59.3 a

Letras distintas entre concentraciones diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

5.8. Actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa fue afectada por la presencia de las NPs de ambos tamaños. Las NPs pequeñas a 400 mg L⁻¹ disminuyeron actividad nitrogenasa hasta en 94% (Cuadro 12). El aumento de la concentración de las NPs grandes (238±30.7 nm) redujo en menor proporción (77 %) la actividad nitrogenasa, en comparación con las NPs pequeñas (Cuadro 13; Figura 14).

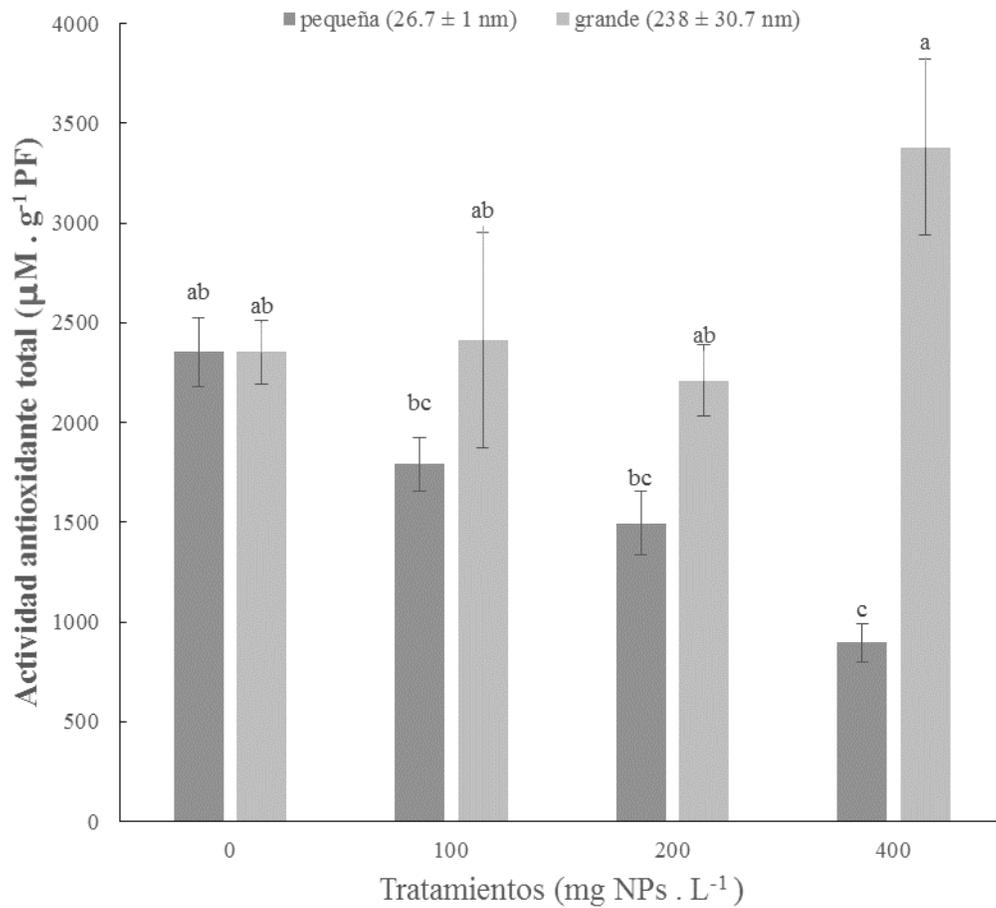


Figura 12. Actividad antioxidante de frondas de *Azolla filiculoides* ante NPs de ZnO pequeñas (26.7±1 nm) y grandes (238±30.7 nm) expuestas durante 6 días. Media ± error estándar, n=9. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PF: peso fresco.

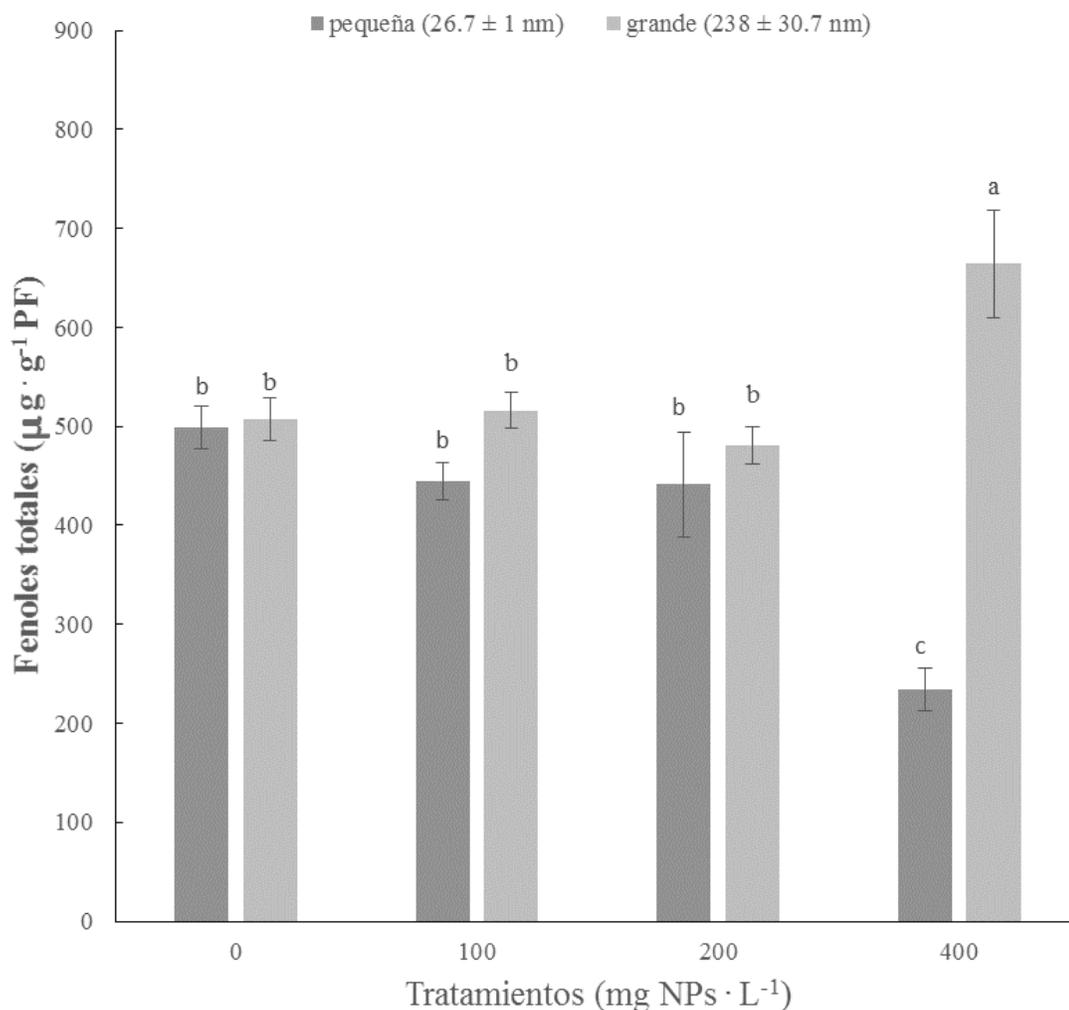


Figura 13. Compuestos fenólicos solubles totales en frondas de *Azolla filiculoides* expuesta a tres concentraciones de NPs de ZnO pequeñas (26.6 ± 1) y grandes (268 ± 30) expuestas durante 6 días. Media \pm error estándar, $n = 9$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PF: peso fresco.

Cuadro 12. Reducción de acetileno por *Azolla filiculoides* en presencia de dos tamaños de NPs de ZnO.

Tamaño de NPs (nm)	Actividad nitrogenasa (μmol de etileno g^{-1})
Pequeña (26.7 ± 1)	10.13 ± 2.97 a
Grande (238 ± 30.7)	13.16 ± 2.36 a

Letras distintas indican diferencias significativas entre tamaños (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 13. Reducción de acetileno por *Azolla filiculoides* en presencia de NPs de ZnO en diferentes concentraciones.

Concentración de NPs ($\text{mg NPs} \cdot \text{L}^{-1}$)	Actividad nitrogenasa (μmol de etileno $\cdot \text{g}^{-1}$)
0	29.75 ± 3.0 a
100	6.36 ± 2.0 b
200	6.141 ± 1.2 b
400	5.14 ± 1.2 b

Letras distintas indican diferencias significativas entre tamaños (Tukey, $p \leq 0.05$)

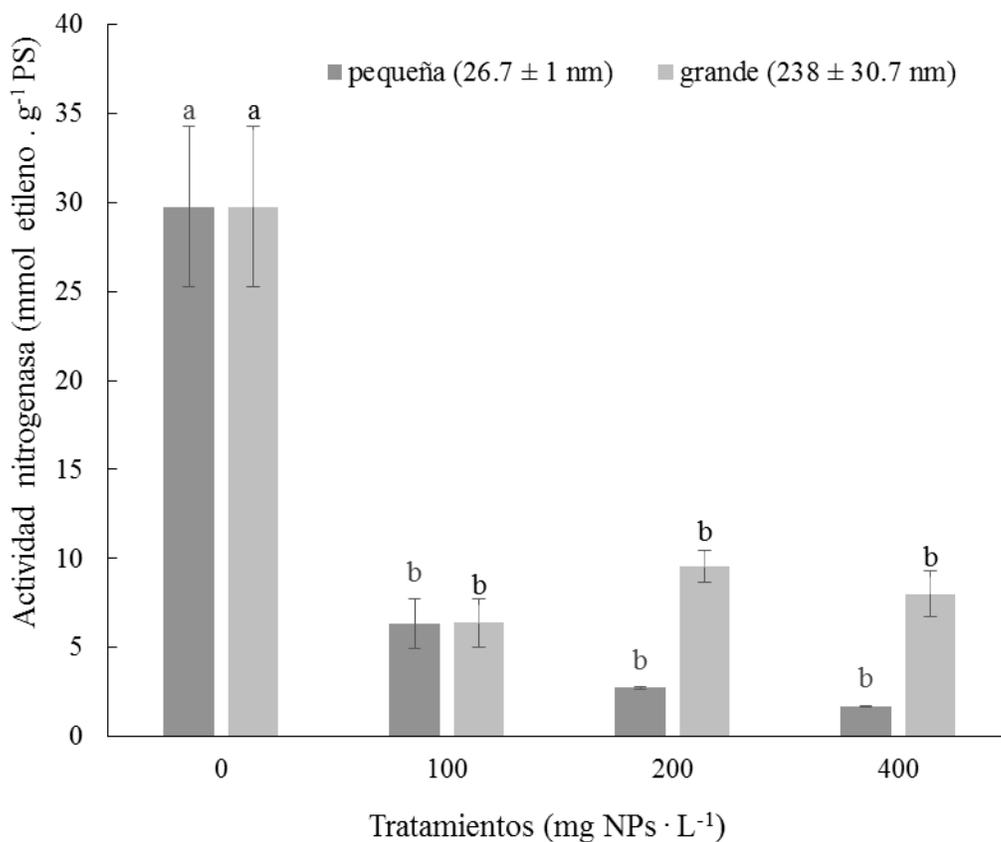


Figura 14. Actividad nitrogenasa medida por la reducción de acetileno por *Azolla filiculoides* en presencia de NPs de ZnO (26.7 ± 1 nm) y grandes (238 ± 30.7 nm) a los 6 días. Media \pm error estándar, n=5. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$); PS: peso seco.

5.9 Microanálisis de Zn mediante EDS-MEB

La abundancia de Zn en las frondas de *A. filiculoides* mostró diferencias entre

tratamientos, y fue más abundante en el envés en todas las concentraciones, en comparación con el haz (Figura 15). Los tratamientos con NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm) presentaron mayor porcentaje de Zn al aumentar la concentración (100, 200 y 400 mg L⁻¹) con respecto al testigo. En contraste, las NPs grandes (238 ± 30.7 nm) mostraron menor contenido en frondas, al aumentar las concentraciones (Cuadro 14).

Cuadro 14. Microanálisis de Zn mediante EDS-MEB de *A. filiculoides*, sometido a tratamientos con NPs de ZnO

Tamaño de NPs (nm)	Tratamiento (mg NPs L ⁻¹)	Elemento Zn (% peso)
	Testigo	0
Pequeña (26.7 ± 1)	100	19.9 ± 1.8 d
	200	41.3 ± 4.1 cd
	400	72.3 ± 6.6 a
Grande (238 ± 30.7)	100	65.3 ± 6 ab
	200	48.3 ± 3.3 bc
	400	20.3 ± 4.6 d

Letras distintas indican diferencias significativas entre tamaños (Tukey, $p \leq 0.05$), $n=3$.

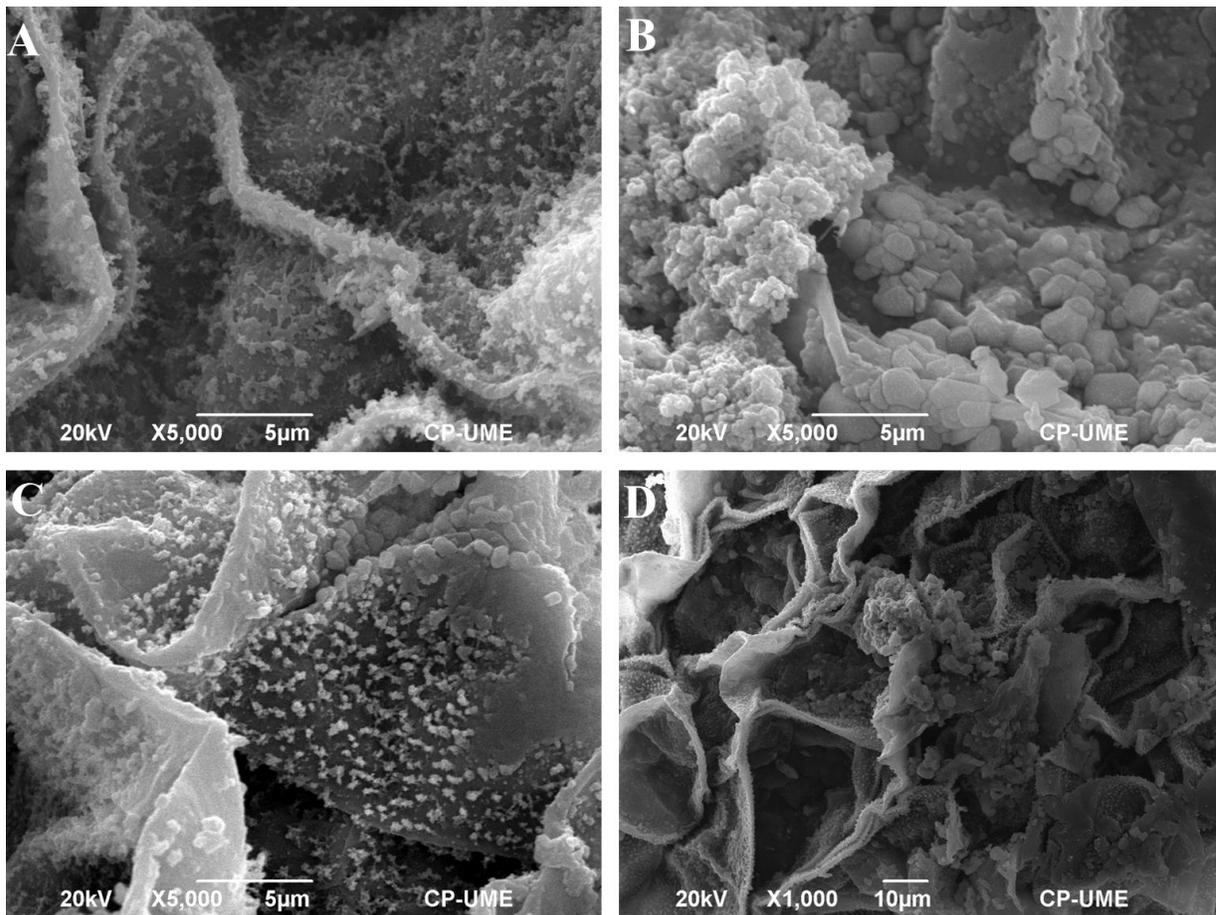


Figura 15. Micromorfología de frondas de *A. filiculoides* expuesta a NPs de ZnO (200 mg L⁻¹). A) Micrografía de superficie adaxial de frondas sin presencia de NPs de ZnO pequeñas (26.7 ± 1 nm); B) Superficie abaxial de fronda con presencia de NPs de ZnO pequeñas agregadas; C) Micrografía de superficie adaxial de frondas sin presencia de NPs de ZnO grandes (238 ± 30.7 nm); D) Superficie abaxial con NPs grandes de ZnO agrgadas.

6. DISCUSIÓN

Las NPs de ZnO grado reactivo (pequeñas), indicaban en la etiqueta del frasco, un tamaño de partícula <120nm, pero en la presente investigación se confirmó un tamaño promedio de 26.7 ± 1.0 nm, con una frecuencia mayor de 21 a 30 nm. Además, el uso de MET permitió observar una textura lisa y forma isodiamétrica de las partículas. Las NPs ZnO de grado farmacéutico fueron más grandes (238 ± 30.7 nm), de textura lisa, y el largo fue tres veces mayor que el ancho. Esto indica la importancia de realizar una caracterización de tamaño y forma de las NPs que se utilicen en investigaciones relacionadas con la nanotoxicidad.

Efecto de NPs ZnO en el crecimiento de *Azolla filiculoides*

Desde el punto de vista ecológico, la biomasa de una planta brinda ventajas de bioremediación, al proporcionar mayor superficie de absorción en el caso de la raíz, y mayor supervivencia en hábitats donde el agua y los nutrientes son limitantes (Villar *et al.*, 2004). La tasa relativa de crecimiento de *A. filiculoides* no fue afectada por las NPs, pero la tasa de duplicación fue reducida en ambos tamaños de partícula, en la concentración de 400 mg NPs L⁻¹, y en las NPs pequeñas en la concentración de 100 mg L⁻¹. La reducción de la biomasa es causada por la lípido-peroxidación de membranas celulares, lo cual se debe al estrés oxidativo generado por las NPs (Ma *et al.*, 2013). En contraste, los resultados del presente estudio sugieren cierta tolerancia del helecho a la presencia de NPs grandes, y menor tolerancia a las NPs pequeñas, por lo cual *A. filiculoides* sería una especie tolerante y buen candidato para la fitoremediación, por mantener su crecimiento y tener una tasa de duplicación rápida (6-5 día⁻¹). Además, según Quintero y Ferrera-Cerrato (1992), esta especie es una importante fuente de materia orgánica.

Pigmentos fotosintéticos y fluorescencia de clorofila

Las NPs grandes no afectaron significativamente el contenido de pigmentos fotosintéticos en *A. filiculoides*, pero las NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm), redujeron la Chla y la Chlb, en 44 % en promedio, con respecto al testigo. Estos resultados son similares a los observados en *Salvinia natans*, donde se evaluó el efecto de NPs de ZnO (25 nm) a concentraciones de 1, 10, 20, y 50 mg L⁻¹ (Hu *et al.*, 2013). Las NPs producen peroxidación en las membranas del cloroplasto, perturbando la acumulación de pigmentos y la fotosíntesis (Ma *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013). Las NPs pequeñas redujeron particularmente la concentración de carotenoides (c+x) en el helecho. Los carotenos y xantofilas se encuentran en los tilacoides de los cloroplastos y pueden detoxificar varias formas de oxígeno activado producidos por la excitación de los complejos fotosintéticos por la luz (Hu *et al.*, 2013). El β -caroteno actúa directamente amortiguando el estado de excitación de la clorofila triplete, lo cual impide la generación de oxígeno singlete, y así evitar el estrés oxidativo (Foyer y Shigeoka, 2011). En este sentido, las NPs pequeñas (26.7 ± 1 nm), al reducir el contenido de x+c de *A. filiculoides* podrían considerarse más tóxicas que las NPs grandes. En *Oryza sativa*, las NPs de Ag pequeñas (25 nm) afectaron la cantidad de pigmentos, impidiendo la habilidad de las plantas para mitigar el efecto de las especies reactivas de oxígeno, causando mayor fitotoxicidad por su tamaño pequeño (Prakash *et al.*, 2014). La toxicidad de las NPs pequeñas está asociada a su tamaño ya que éstas tienen mayor proporción área/volumen, y máxima absorción, por lo que pueden perturbar más rápidamente la fotosíntesis y el sistema antioxidante de las plantas (Mazumdar & Ahmed, 2011). Por el contrario, las NPs grandes (238 ± 30.7 nm) no disminuyeron significativamente el contenido de clorofila total en *A. filiculoides* respecto al testigo, y el contenido de x+c fue similar en todas las concentraciones, inclusive los niveles de

Chla y Chlb aumentaron ante 100 y 200 mg L⁻¹. Esta respuesta fue similar a la encontrada en *Azolla microphylla* expuesta a bajas dosis de luz UV-C (245 nm), la cual indujo la síntesis de pigmentos protectores, con mayores niveles de clorofila total y los carotenos fueron los menos afectados (Jayakumar *et al.*, 1999). Por lo anterior, las NPs grandes de ZnO pueden considerarse menos tóxicas para *A. filiculoides*.

El potencial fotoquímico (Fv/Fm) mide la eficiencia del transporte de electrones o eficiencia cuántica del PSII al PSI. Este potencial es usado como un indicador de estrés en plantas, y permite caracterizar los efectos y modos de acción de diferentes tipos de estrés ambiental, como lo es la contaminación del agua por metales pesados, herbicidas y detergentes (Moreno *et al.*, 2008). Los valores máximos de eficiencia de la fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) en plantas sanas son mayores a 0.7 (Butler y Kitajima, 1975; Sánchez *et al.*, 2010).

La exposición de *A. filiculoides* a NPs de ZnO redujo significativamente la fluorescencia de clorofila, independientemente del tamaño y de la concentración de las NPs. Los metales pesados tienen un efecto tóxico en la fluorescencia de clorofila de las plantas acuáticas como *Azolla* (Michalak, 2006; Viehweger 2014). La exposición de *A. filiculoides* y *A. caroliniana* al ion cobre (2 mM Cu²⁺) pueden reducir significativamente los niveles de Fv/Fm a las 35 h de exposición (Sánchez *et al.*, 2011). En el presente estudio, *A. filiculoides*, las NPs pequeñas (26.7±1 nm) a 100 mg L⁻¹, causaron un efecto negativo y redujeron en 22% el Fv/Fm, en comparación con las NPs grandes (238±30.7 nm), las cuales disminuyeron la fluorescencia en 15 %.

La disminución en la fluorescencia de clorofila indica menor rendimiento de los centros de reacción de la plastocianina, para catalizar la transferencia eficiente de los electrones entre el PSII (citocromo b₆f) y el PSI; implicando un posible daño en la capacidad del aparato

fotosintético para utilizar toda la energía captada por los pigmentos antena (Küpper *et al.*, 2002; Letelier *et al.*, 2005, 2010). La reducción de Fv/Fm en *A. filiculoides* causada por las NPs de ZnO puede ser explicada en parte, por el efecto negativo del ion zinc, en la reacción fotoquímica del PSII, en la cual el transporte de electrones se bloquea (Tyystjärvi, 2008; Padua *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indican que las NPs de ZnO pueden provocar alteraciones en el aparato fotosintético de *A. filiculoides* y, por lo tanto, constituyen indicadores confiables y rápidos del estado fisiológico de este helecho. Así, este estudio es el primer reporte sobre el efecto de NPs de ZnO en la fluorescencia de la clorofila de *A. filiculoides*.

Actividad antioxidante total y compuestos fenólicos solubles totales

Durante la exposición a condiciones de estrés por metales pesados, la cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROS) incrementa, lo cual activa la producción de moléculas antioxidantes. Estos compuestos antioxidantes (enzimáticos o no enzimáticos) retardan o inhiben la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas; pueden prevenir las reacciones en cadena de la oxidación, lo cual retrasa las reacciones de degradación; así, los antioxidantes desempeñan una función importante en la detoxificación de EROS (Matthäus, 2002; Sakihama *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2012). Los antioxidantes se clasifican en enzimáticos (catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, peroxidasa), y no enzimáticos (ácido ascórbico, tocoferol, polifenoles, carotenoides, polifenoles, antocianina y otros (Foyer y Noctor 2005). En la presente investigación se midieron la actividad antioxidante total y los compuestos fenólicos totales, como indicadores de la respuesta antioxidante de la planta al

estrés producido por las NPs de ZnO. Durante el estrés por metales pesados los compuestos fenólicos pueden actuar como quelantes del metal, y pueden neutralizar directamente las EROS. Compuestos fenólicos, como los flavonoides y fenilpropanoides son oxidados por la peroxidasa, y actúan en la neutralización de H₂O₂. Hay evidencias de la inducción del metabolismo de polifenoles como respuesta a estrés por metales pesados (Michalak, 2006).

Las NPs de ZnO grandes (238±30.7 nm) no modificaron significativamente la actividad antioxidante total de *A. filiculoides* en las concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹, pero la mayor concentración resultó en un aumento de 39%; en contraste, las NPs de ZnO pequeñas (26.7±1 nm) redujeron en 70% la actividad antioxidante total. La exposición de *Fagopyrum esculentum* a NPs de ZnO (100 mg L⁻¹) promovió la acumulación de los antioxidantes GSH y actividad de catalasa; lo cual es un mecanismo de defensa ante un elemento tóxico (Lee *et al.*, 2013). Estas observaciones indican que *A. filiculoides* tiene tolerancia a las NPs de ZnO grandes pero no a las NPs pequeñas.

Los compuestos fenólicos son moléculas importantes para las plantas, por su habilidad para secuestrar radicales libres. Los compuestos fenólicos sugieren la activación del sistema de detoxificación de la planta en condición de estrés severo, y su aumento puede mejorar la capacidad antioxidante, ya que los fitofenoles actúan como donadores de electrones para detoxificar la acumulación de H₂O₂ (Sánchez *et al.*, 2010; Forni *et al.*, 2012). Para el caso de toxicidad por NPs de ZnO, en el presente estudio, la respuesta antioxidante de las NPs grandes o pequeñas fue diferente. El helecho *A. filiculoides* presentó mayor tolerancia a las NPs grandes, presumiblemente por la activación del sistema primario de detoxificación; manteniendo los niveles de antioxidantes totales y compuestos fenólicos totales en las concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹, pero en la concentración de 400 mg L⁻¹ los niveles de estas moléculas se elevaron significativamente en 39% (actividad antioxidante), y en 30%

(compuestos fenólicos). En contraste, las NPs de ZnO pequeñas abatieron la actividad antioxidante total, en función de la concentración, hasta reducirse en 70% con respecto al testigo ante 400 mg L⁻¹. La disminución de la actividad antioxidante y de los compuestos fenólicos totales en presencia de NPs pequeñas podría indicar el agotamiento del sistema producido por un exceso de radicales libres, pero los niveles de compuestos fenólicos se mantuvieron sin cambios en las concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹, lo cual indica que estos compuestos en *A. filiculoides* son las principales moléculas que promueven el sistema de detoxificación, y la protección ante el estrés producido por las NPs de ZnO (Forni *et al.*, 2012).

Respecto a la toxicidad de metales pesados en plantas acuáticas, como *A. filiculoides* y *Lemna minor* expuestas a iones de cadmio (10 ppm) y uranio (6 ppm), los compuestos fenólicos son acumulados en raíces (14.3 y 23.9 ppm), a la vez se aumenta la actividad antioxidante, la cual puede activarse por la donación de electrones a enzimas como la guaiacol peroxidasa para la detoxificación de H₂O₂ acumulado durante el estrés (Sela *et al.*, 1988; Forni *et al.*, 2012; Sakihama *et al.*, 2002).

Los metales pesados inducen estrés oxidativo en las células de diferentes maneras: a) transfieren electrones a O₂ para generar EROS; b) los metales perturban rutas metabólicas, especialmente en la membrana tilacoidal, lo cual resulta en la formación de radicales libres y EROS; c) los metales inactivan enzimas antioxidantes (peroxidasas, catalasa, superóxido dismutasa), aunque las peroxidasas también pueden activarse; d) la acumulación de metales reduce los antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión, el cual es consumido durante la formación de fitoquelatos (Sahw *et al.*, 2004; Michalak, 2006).

En un estudio del comportamiento de NPs de ZnO agregadas a un medio de cultivo sin plantas, la suspensión fue inicialmente sonicada, las partículas tendieron a agregarse en

partículas de 1.4 μm a los 60 min, a las 8 h el tamaño de la partícula se redujo a 1 nm en el sobrenadante, mientras que en el fondo del recipiente se agregaron precipitados blancos (Hu *et al.*, 2013). Por lo tanto, la reducción en el tamaño de las partículas puede estar determinada por la tasa de disolución del ZnO, para producir iones Zn^{2+} . Este fenómeno sugiere que la toxicidad de las NPs de ZnO en el presente estudio podría estar dado por los iones del metal (Zn^{2+}) pesado disuelto en el medio de cultivo. Así mismo, las NPs pequeñas estarían disueltas con mayor uniformidad en el medio, manteniendo niveles más altos de Zn^{2+} en el medio produciendo un efecto más tóxico que las partículas grandes.

Evaluación de actividad nitrogenasa

El helecho *A. filiculoides* forma una simbiosis con la cianobacteria *Anabaena azollae* la cual fija nitrógeno atmosférico. *Anabaena* es un componente esencial del simbio-sistema *Azolla-Anabaena* ya que esta cianobacteria facilita la disponibilidad de nitrógeno para el helecho, aumentando la eficiencia de absorción y asimilación de este nutriente, y promoviendo el crecimiento de la planta, por lo que la perturbación de este equilibrio simbiótico indicaría toxicidad en el medio. En el presente estudio la actividad nitrogenasa se evaluó como un indicador de la toxicidad de las NPs de ZnO.

La eficiencia de la fijación de N_2 en *A. filiculoides* es medida indirectamente por la reducción de acetileno, reacción análoga que se lleva cabo durante la reducción de N_2 por la enzima nitrogenasa (Vessey, 1994). La evidencia de fijación de N_2 por *A. filiculoides* es escasa porque involucra limitaciones en el uso de trazas de nitrógeno (Reddy, 1987). La actividad reductora de acetileno es el análisis del flujo total de electrones a través de la nitrogenasa, a diferencia de la medición de fijación de N_2 que se realiza en periodos de tiempo y no por el flujo de electrones que reduce el N_2 a NH_3 (Vessey, 1994).

La presente tesis incluye el primer reporte del efecto de las NPs metálicas en *Anabaena azollae*. La actividad nitrogenasa, medida como μmoles de etileno por g de peso seco de *A. filiculoides*, fue afectada por la exposición de las NPs de ZnO, con una reducción del 79% y 83%, ante concentraciones de 100 y 400 mg L^{-1} , respectivamente, con respecto al testigo, siendo más pronunciado el efecto con las NPs pequeñas, las cuales redujeron la actividad nitrogenasa en 66%, en comparación con las NPs grandes (56%). La generación de etileno sería una respuesta temprana al estrés por metales pesados o por compuestos tóxicos como el SDS (50 y 100 ppm) en *A. filiculoides* y *Lemna minor* donde se detectaron diferencias en comparación con plantas sin tratamiento (Forni *et al.*, 2012). Sin embargo, en el simbio-sistema *Azolla-Anabaena*, del presente estudio, la exposición a NPs grandes no afectó el crecimiento, la clorofila total, la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos totales, pero la actividad nitrogenasa se redujo en 56%. Por lo que esta última variable puede considerarse como biomarcador de la toxicidad causada por las NPs.

Distribución de Zn mediante EDS-MEB

El análisis elemental permitió detectar mayor acumulación relativa (%) de Zn en el envés de la fronda. Las NPs de ZnO se observaron como aglomerados, sobre la epidermis abaxial, y adheridas a las raíces; pero la acumulación aumentó en función de su concentración. Estas observaciones fueron similares al estudio con *Fagopyrum sculentum*, donde las NPs de ZnO se encontraron en la superficie de la raíz, y la acumulación de Zn aumentó con la concentración de las NPs de ZnO (Lee *et al.*, 2013). La casi ausencia del Zn en el haz, sugiere poca traslocación del elemento hacia la parte superior y fotosintética de la fronda. La absorción, el transporte y la acumulación de nanomateriales pueden depender de la especie de la planta, así

como del tamaño, tiempo de exposición, composición química, funcionalización y estabilidad de las NPs (Hu *et al.*, 2013). Los anteriores resultados confirman la tolerancia de *A. filiculoides* a la exposición de las NPs de ZnO.

7. CONCLUSIÓN

Las NPs de ZnO, no afectaron el crecimiento ni la tasa de duplicación de *A. filiculoides*, con excepción de la concentración 400mg L⁻¹, con respecto al testigo, la cual redujo la tasa de duplicación. Esta especie vegetal sería un buen candidato para la remediación de NPs de ZnO, por mantener su crecimiento y ser una especie con una rápida tasa de duplicación. Las NPs de ZnO grandes no afectaron significativamente el contenido de pigmentos fotosintéticos, pero las NPs pequeñas redujeron la concentración Chla y Chlb, y carotenoides. La fluorescencia de clorofila, presentó una pequeña pero significativa reducción en presencia de NPs, independientemente del tamaño y de la concentración.

La respuesta antioxidante de *A. filiculoides* fue significativa al estrés producido por la NPs de ZnO. La exposición a NPs de ZnO grandes no modificó la actividad antioxidante total, e inclusive en la mayor concentración ésta aumentó. En contraste, las NPs de ZnO pequeñas redujeron la actividad antioxidante total.

Azolla filiculoides tiene la capacidad de responder al estrés oxidativo causado por las NPs grandes pero no a las pequeñas; además, la actividad nitrogenasa, exclusiva de la cianobacteria *Anabaena*, es un mejor indicador de la toxicidad de las NPs de ZnO.

8. LITERATURA CITADA

- Abbott, L.C and Maynard A.D. 2010. Exposure assessment approaches for engineered. Nanomaterials. Risk Analysis 30 (11): 1634-1644.
- Ahamed, M., M.A Siddiqui, M.J Akhtor, I. Ahmad, A.B. Pat, H.A. Alhadlaq. 2010. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cell. Biochemistry Biophysics Research Community 396: 578-583.
- Arora, A., S. Saxena, 2005. Cultivation of *Azolla microphylla* biomass on secondary-treated Delhi municipal effluents. Biomass Bioenergy 29: 60-64.
- Ávalo, A., A.I. Haza, D., P. Morales. 2013. Nanopartículas de plata: aplicaciones riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 7 (2): 1-23.
- Baird, C., 1998. Environmental Chemistry, Editorial Freeman and Co., New York, EEUU, 557 p.
- Bennicelli, R., Z. Stepniewska, A. Banach, K. Szajnocha, J. Ostrowski. 2004. The ability of *Azolla caroliniana* to removed Hg (II), Cr (III), Cr (VI) from municipal waste water. Chemosphere 55: 141-146.
- Blanco, E., A. Hsiao, A.P. Mann, M.G. Landry, F. Meric, M. Ferrai. 2011. Nanomedicine in cáncer Therapy: Innovartive trends and prospects. Cancer Science 102 (7): 1247-1252.
- Blinova, I., A. Ivask, M. Heinlaan, M. Mortimer, A. Kahru. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environmental Pollution 158 (1): 41-47.
- Borm, P., F.C. Klaessig, T.D. Landry, B. Moudgil, J. Pauluhn, K. Thomas, R. Trottier, S. Wood. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of

- dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicological Sciences* 90 (1), 23-32.
- Boxall, A., Q. Chaudhry, C. Sinclair, A. Jones, R. Aitken, B. Jefferson, C. Watts. 2007. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Central Science Laboratory, York
- Brunner, T.J., P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R.N. Grass, L.K. Limbach, A. Bruinink, W.J. Stark. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology* 40 (14): 4374-4381.
- Buttler, W.L., M. Kitajima. 1975. Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 376: 116-125.
- Calvo, P., P. Avilés. 2013. A new potential nano-oncological therapy based on polyamino acid nanocapsules. *Journal of Controlled Release* 169: 10-16.
- Carrapico, F., 2006. Is the *Azolla-Anabena* symbiosis a co-evolution case?, en *General Botany: Traditions and Perspectives*, A. Sitnykov, Materials of the International Conference, Published by the Kazan University, Russia, 1: 193-195.
- Cerpa, A., M. Kober, D. Calle, V. Negri, J.M. Gavira, A. Hernanz, F. Briones, S.P. Cerdán y P. Ballesteros. 2013. Single-walled carbon nanotubes as anisotropic relaxation probes for magnetic resonance imaging. *Medicinal Chemistry Communications* 4: 669-672.
- Espinoza, Y. y R. Gutiérrez. 2003. Variabilidad intraespecífica de *Azolla filiculoides* colectadas en la zona centro-occidental de Venezuela. *Revista de Facultad Agronómica* 20:156-167.
- Evrard, C., C. Van-Hove. 2004. Taxonomical of the American *Azolla* species (Azollaceae), en *A Critical Reviews in System Geography Plants* 74: 301-318.

- Fabrega, J., R. Tantra, A. Amer, B. Stolpe, J. Tomkins, T. Fry, J.R. Lead, C. R. Tyles, T.S. Galloway. 2011. Sequestration of zinc from zinc oxide nanoparticles and life cycle effects in the sediment dwelling amphipod *Corophium volutator*. *Environmental Science & Technology* 46 (2): 1128-1135.
- Forni, C., R. Braglia, F.J.M. Harren, S.M. Cristescu. 2012. Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS). *Aquatic Toxicology* 110–111: 107-113.
- Foyer, C. H. and S. Shigeoka. 2011. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiology*. 155: 93 – 100.
- Foyer, C.H., G. Noctor. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environmental* 28:1056–1071
- Foyer, C.H., G. Noctor. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17:1866-1875.
- Gottschalk, F., T. Sonderer, R.W. Scholz, B. Nowack. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science Technology* 43: 9216–9222.
- Grassian, V.H. 2008. When size really matters: size-dependent properties and Surface chemistry of metal and metal oxide nanoparticles in gas and liquid phase environments. *Journal of Physical Chemistry* 112 (47): 18303-18313.
- Hao, L, L. Chen. 2012. Oxidative stress response in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80 (0): 103-110.

- Hernández, O.H.A., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, M.H.A. Zavaleta, D.H.A. López, L.M.R. Mendoza. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diésel-contaminated substrate. *Journal of Environmental Management* 95: 5319-5324.
- Hu, C., X. Liu, X. Li. and Y. Zhao. 2013. Evaluation of growth and biochemical indicat of *Salvinia natans* exposed to zinc oxide nanoparticles and zinc accumulation in plants. *Environmental Science Pollution Reserch* 21: 732-739.
- Huang, Y., S. C. Lenaghan, L. Xia, J. N. Burris, C. N. Stewart Jr., M. Zhang. 2013. Characterization of physicochemical properties of ivy nanoparticles for cosmetic application. *Journal of Nanobiotechnology* 11: 3-14.
- Jayakumar, M., M. Eyini, P. Selvinthangadurai, K. Lingakumar, A. Premkumar, G. Kulandaivelu. 1999. Changes in pigment composition and photosynthetic activity of aquatic fern (*Azolla microphylla* Kaulf.) exposed to low doses of UV-C (245 nm) radiation. *Photosynthetica* 37: 33-38.
- Karlsson, H.L., P. Cronhdm, J. Gustafsson, L. Möller. 2008. Copper oxide nanoparticles highly toxic: a comparation between metal oxide nanoparticle and carbon nanotubes. *Chemistry Research Toxicology* 21(9): 1726-1732.
- Kole, C., P. Kole, K.M. Randunu, P. Choudhary, R. Podila, P.C. Ke, A.M. Rao, R.K. Marcus. 2013. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnology* 13:37
- Küpper, H., I. Šetlík, M. Spiller, F.C. Küpper and O. Prášil. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal Phycology* 38: 429–441.

- Landa, P., R. Vankova., J. Andriova, J. Hodek, P. Marsik, H. Storchova, J.C. White, T. Vanek. 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂ and fullerenes soot. *Journal of Hazardous Materials* 241-242: 52-62.
- Lee, S., Kim S., Kim S., Lee I., 2013. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environmental Science Pollution Research* 20: 848- 854.
- Letelier, M., L.J. Sánchez-Jofré, P. Peredo-Silva, E. Cortés-Troncoso, Aracena-Parks. 2010. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein- binding effects. *Chemico-Biological Interactions* 188: 220-227.
- Lichtenthaler, H.K. and A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transaction* 11: 591-592.
- Lin, D. and B. Xing. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 20: 1-8.
- Lin, D. and B. Xing. 2008. Root uptake and phytotoxicity on ZnO nanoparticles. *Environmental Science Technology* 42: 5580-5585.
- López, M.M.L., G. De la Rosa, V.J.A. Hernández, M.H. Castillo, C.E. Bote, V.J.R. Peralta, T.J.L. Gardea. 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environmental Science Technology* 44: 7315- 7320.
- Love, S.A., J.M.A. Maurer, J.W. Thompson, Y.S. Lin, C.L. Hayness. 2012. Assessing nanoparticles toxicity. *Annual Review of Analytical Chemistry* 5:181-205.
- Ma, H., P.L Williams, S.A. Diamond. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles A review. *Environmental Pollution* 172:76-85.

- Mahmoundi, M., A. Simchi, M. Imani, M.A. Shokrgozar, A.S. Milani, V.O. Hafeli, S. Pieter. 2010. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75(1): 300-309.
- Manzo, S., A. Rocco, R. Carotenuto, F. De Luca Picione, M. Milgietta, G. Rametta, G. Di Francia. 2011. Investigation of ZnO nanoparticles ecotoxicology effects toward different soil organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 18 (5): 756-763.
- Matthäus, M. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 3444-3452.
- Mayer, A., M. Vadon, B. Rinner, A. Novak, R. Wintersteiger, E. Fröhlich. 2009. The role of Nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology* 258: 139-147.
- Maynard, A.D., 2007. Nanotechnology: The next big thing, or much ado about nothing?. *Annals of Occupational Hygiene* 51(1): 1-12.
- Mazundar, H., G.U. Ahmed. 2011. Phytotoxicity effects of silver nanoparticles on *Oryza sativa*. *International Journal Chemistry Technology Research* 3: 1494-1500.
- Miao, A.J., X.Y. Zhang, Z. Luo, C.S. Chen, W.C. Chin, P.H. Santschi, A. Quigg. 2010. Zinc oxide engineered nanoparticles: dissolution and toxicity to marine phytoplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (12): 2814-2822.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15 (4): 523-530.
- Moreno, S.G., H.V. Perales, M.O.A. Salcedo. 2008. La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *REB* 27 (4): 119-129.

- Moore, A. W. 1969. Azolla: Biology and agronomic significance. *The Botanical Review* 35(1): 17-34.
- Mosquera, L.J., R.A Calderón. 2002. Evaluación de parámetros bioquímicos y morfogenéticos en la simbiosis *Azolla filiculoides*-*Anabaena azollae* como respuesta a la interacción de la calidad de luz y dos niveles de nitrógeno. *Ecología Aplicada* 1:89-94.
- Mudunkotuwa, I.A., T. Rupasinghe, C.M. Wu., V.H. Grassian. 2012. Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir* 28 (1), 396-403.
- Nriagu J.O. y J.M. Pacían. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- Pádua, M., A.M. Cavaco, S. Aubert, R. Bligny, A. Casimiro. 2010. Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: interaction with manganese. *Physiology Plant* 138: 301-11.
- Panyala, N.R., M.E.M. Peña, J. Havel. 2008. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environmental and human health?. *Journal of Applied Biomedicine* 6 (3):117-129.
- Prakash, M., G. Nair, I. M. Chung. 2014. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* 112: 105-113.
- Premanathan, M., H. Kart, K. Keyan, K. Jeyasubramanian, G. Manivannan. 2011. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward gram-positive bacteria and cancer cell by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 7 (2): 184-192.
- Quintero, L. R. y F. Ferrera- Cerrato. 1992. Azollatum “Alfredo Echegaray Alemán” En: J. L. Tovar y R. Quintero (eds.). *La investigación edafológica en México. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo.* 242p.

- Rahmani, G.N.H. and S.P.K. Sternberg. 1999. Bioremoval of lead water using *Lemna minor*. *Biorsource Technology* 70: 225-230.
- Rahmani, M.A. and H. Hasegawa. 2011. Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere* 83:633-646.
- Rai, P.K. and B.D. Tripathi. 2009. Comparative assessment of *Azolla pinnata* and *Vallisneria spiralis* in Hg removal from G.B. Sagar of Singrauli industrial region, India. *Environmental Monitoring Assessment* 148:75-84.
- Rai, P.K., 2008. Phytoremediation of Hg and Cd from industrial effluents using on aquatic free floating macrophytes *Azolla pinnata*. *International Journal Phytoremediation* 10:430-439.
- Rakhshae, R., M. Khosravi, M.T. Ganji. 2006. Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb (II), Cd (II), Ni (II) and Zn (II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*. *Journal Hazard Mater* 134:120-129.
- Rana S. y Kalaichelvan P.T. 2013. ReviewArticle Ecotoxicity of Nanoparticles. Hindawi Publishing Corporation ISRN Toxicology. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/574648>
- Reddy, K.R., 1987. Nitrogen fixation by *Azolla* cultured in nutrient enriched waters. *Journal Aquatic Plant Management* 25:43-48.
- Reed, R.B., D.A. Ladner, C.P. Higgins, P. Westerhoff, J.F. Ranville, 2012. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (1): 93-99.
- Rico, C.M., S. Majumdor, G. M. Duarte, V.J.R Peralta., T.J.C. Gardea. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 59: 3485-3498.

- Sadrieh, N., A.M. Wokovich, N.V. Gopee, J. Zheng, D. Haines, D. Parmiter, P.H. Siitonen, C.R. Cozart, K. Patri, S.E. McNeil. 2010. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicology Science* 115:156–166.
- Sahw, B.P., S.K. Sahu, R.K. Mishra. 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. in: Presad, M.N.V. (Ed.), *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*, second ed. Springer, Berlin, 84–126 pp.
- Sakihama, Y., M.F. Cohen, S.C. Grace, H. Yamasaki. 2002. Phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolic-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177:67-80.
- Sánchez, V. G., 2011. Mecanismos de tolerancia del biosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante arsénico y cobre. Tesis. Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Estado de México, 159 pp.
- Sánchez, V. G., M. D. González, A. Alarcón y C.R. Ferrera. 2010. Copper Effects on Photosynthetic Activity and Membrane Leakage of *Azolla filiculoides* and *Azolla caroliniana*. *International Journal Agricultur Biology* 12(3): 365–368.
- Sánchez V.G., C.R. Ferrera, A. Alarcón. 2011. Short-Term Effects of Arsenate-Induced Toxicity on Growth, Chlorophyll and Carotenoid Contents, and Total Content of Phenolic Compounds of *Azolla filiculoides*. *Water Air Soil Pollution* 217:455–462.
- Schulenberg M., 2008. Nanoparticles-small things, big effects oportunites and risks. Federal Ministry of Education and Research, Berlin Germany.
- Sculthorpe, C. D. 1967. *Biology of aquatic vascular plants*. E. Arnold. London, 610 pp.
- Sela M., E. Tel-Or, E. Fritz, A. Huttermann. 1988. Localization and Toxic Effects of Cadmium, Copper, and Uranium in *Azolla*. *Plant Physiology* 88:30-36.

- Sheng M., M. Tang, H. Chen, B. Yang, F. Zhang, Y. Huang. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salts stress. *Mycorrhiza* 18: 287-296.
- Smith A.R., K.M. Pryer, E. Schvettpelz, P. Korall, H. Schneider, R. Cranfill. 2006. A classification for extant ferns. *Taxa* PG Wolf 55: 705-731.
- Smitha S., S. Gupta, A. Bartonova, M. Dusinka, A. Gutleb y Q. Rahman. 2012. Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health* 11: 1 – 11.
- Strigul N., L. Vaccari, C. Galdon, M. Wazne, X. Liu, C. Christodoulatos, K. Jasinkiewicz. 2009. Acute toxicity of barium, titanium oxide and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Desalination* 248: 771-782.
- Swain, T. & W.E. Hills. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal Science Food Agriculture* 10: 63 - 68.
- Tyystjärvi E. 2008. Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252: 361-376.
- Van-Hove, C., 2004. Taxonomy of the American *Azolla* species (Azollaceae): A critical review. *Systematics and Geography of Plants* 74:301-318.
- Veselý T., P. Tlustoš, J. Száková. 2011. The use of water Lettuce (*Pistia stratiotes* L.) for rhizofiltration of a highly polluted solution by cadmium and lead. *International Journal of Phytoremediation* 13(9): 859-872.
- Vessey J.K., 1994. Measurement of nitrogenase activity in Legumen roots nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil* 158: 151 - 162.

- Villar, R., J. Ruiz-Robledo, J.L. Quero, H. Poorter, F. Valladares, T. Marañón. 2004. Tasa de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas, en Valladares, F. ; Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante, Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S.A. Madrid, ISBN 84-8014-552- 8 (8): 191-227.
- Viehweger K. 2014. How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies* 55:35 (doi:101186/1999-3110-55-35).
- Wagner, G.M. 1997. Azolla: a review of its biology and utilization. *The Botanical Review* 63: 1-26p.
- Wang H., R.L. Wick, B. Xing. 2009. Toxicity of nanoparticle and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* 157 (4): 1171-1177.
- Xia T., M. Kovochich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J.I. Yeh, J.I. Zink, A.E. Nel. 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties, *ACS nano* 2 (10): 2121-2134.
- Yang H., C. Liu, D. Yang, H. Zhang, Z. Xi. 2009. Comparative study of cytotoxicity oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particles size, shape and composition. *Journal Appl. Toxicology* 29 (1): 69 - 78.
- Yang I. and D.J. Watts. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology letters* 158 (2): 122 - 135.
- Yoshida S., D. Forno, J. Cock & K. Gomez. 1971. Laboratory manual for physiological studies of rice, 3rd ed. Manila Philippines: International Rice Research Institute.
- Zavaleta M.H.A., N.A.R. Vilchis, C.L.M. López, A.J. Arenas, R.G. Hanako, G.M.M. Crosby. 2013. La nanociencia y la nanotecnología: Herramientas para medir lo diminuto. *Agroproductividad* 6 (4): 15 - 23.