

INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL
EFECTOS DE LOS MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE
CARBÓN Y SILICIO EN EL CRECIMIENTO DEL ALGA
Pseudokirchneriella subcapitata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A
ULISES DUVAN RODRIGUEZ DIAZ

DIRECTOR EXTERNO: M.C. YOLANDA PICA GRANADOS
DIRECTOR INTERNO: DRA. CRISTINA LIZAMA BAHENA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL
ESTADO DE MORELOS

INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL

EFFECTOS DE LOS MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE
CARBÓN Y SILICIO EN EL CRECIMIENTO DEL ALGA

Pseudokirchneriella subcapitata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A

ULISES DUVAN RODRIGUEZ DIAZ



DIRECTOR EXTERNO: M.C. YOLANDA PICA GRANADOS

DIRECTOR INTERNO: DRA. CRISTINA LIZAMA BAHENA

JIUTEPEC, MORELOS

AGOSTO, 2019



INGENIERIA EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL

JIUTEPEC, MORELOS A 31 DE JULIO DEL 2019

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DEL TRABAJO DE ESTADÍA

Los que suscriben, miembros del comité sinodal designados por la Dirección de la Ingeniería en Tecnología Ambiental de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos, manifestamos que después de haber evaluado el trabajo de estadía titulado: "EFECTOS DE LOS MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE CARBÓN Y SILICIO EN EL CRECIMIENTO DEL ALGA *Pseudokirchneriella subcapitata*." desarrollado en formato de TESIS por el alumno ULISES DUVAN RODRÍGUEZ DÍAZ, bajo la dirección de la M.C. YOLANDA PICA GRANADOS y la DRA. CRISTINA LIZAMA BAHENA, se ACEPTA para proceder a su impresión.

ATENTAMENTE


M.C. YOLANDA PICA
GRANADOS DIRECTOR RECEPTOR


DRA. CRISTINA LIZAMA BAHENA DIRECTOR
INTERNO


M.C. SERGIO JAVIER PONCE JAHÉN
VOCAL




DR. LUIS GERARDO TREVIÑO QUINTANILLA
COORDINADOR DE LA ASIGNATURA DE ESTADÍA

c.c.p. Dirección académica/Archivo Tecnología Ambiental

Boulevard Cuauhnáhuac #566, Col. Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos. CP
62550 Tel: (777) 229-3500 www.upemor.edu.mx.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mis agradecimientos a la Universidad Politécnica del Estado de Morelos y a sus docentes, quienes me brindaron su conocimiento y experiencia para lograr mi formación tanto profesional como personal.

Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua por permitirme desarrollarme profesionalmente en sus instalaciones.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso, mi más sincero agradecimiento a mi tutora la M. C. Yolanda Pica Granados, por la dedicación y apoyo que me ha brindado en este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección que me ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde el momento que nos conocimos.

A mi tutora interna la Doctora Cristina Lizama Bahena por la revisión cuidadosa que ha realizado de este texto y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

Le agradezco la revisión de este texto a M. C. Sergio Javier Ponce Jahén, gracias por el apoyo brindado en la revisión de este trabajo, así como las sugerencias brindadas.

A la M. en I.Q. Sandra Luz Suastes Acosta, Coordinadora del laboratorio químico-académico y del Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental del Instituto de Estudios Superiores de Tamaulipas, le agradezco por el material facilitado (nanopartículas de grafeno y sílice).

A Kristel Guadalupe Neri Nájera, por haber sido una excelente compañera de tesis y amiga, por haberme tenido la paciencia necesaria y motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación.

Por último, gracias a mis amigos que siempre me han dado un gran apoyo moral y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Claudia Díaz Izazaga y Alberto Rodríguez García, por apoyarme en todo momento, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente formación académica, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo por ser un gran ejemplo a seguir.

A mis hermanos, Diana Evelyn y Argenis Jocsan, por ser parte importante de mi vida y brindarme su amor y cariño en todo momento.

A mi sobrina Renata Jaqueline, por darme la oportunidad de crecer y aprender junto a ti.

RESUMEN

Los materiales nanoestructurados pueden encontrarse con frecuencia en una amplia gama de productos dada su creciente aplicación en distintos campos industriales como la electrónica, computación, farmacéutica, cosmética y la fabricación de pinturas, entre otros. Esto genera la posibilidad de encontrar estos nanomateriales en el medio ambiente y surgen nuevos riesgos asociados a la posible diseminación de materiales nanoestructurales principalmente en ambientes acuáticos, cuyos efectos en los sistemas biológicos no han sido estudiados.

En este trabajo se evaluaron los efectos de los nanomateriales de sílice y grafeno en el crecimiento y desarrollo de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, un organismo útil para generar evidencias sobre los efectos de sustancias en sistemas biológicos dado que forma parte del nivel primario de la cadena trófica, es decir, es un organismo productor primario que interviene en la transformación de nutrientes y en la generación del flujo de energía que sostiene las cadenas tróficas de los sistemas naturales.

Para generar evidencia sobre los efectos de los materiales nanoestructurados de grafeno y sílice, se realizaron pruebas de exposición a través de ensayos de crecimiento algal con la especie *P. subcapitata*, siguiendo el método propuesto por Blaise *et al.*, (2000) y adaptado por Pica-Granados *et al.*, (2004). Dicho método se basa en la determinación del efecto de inhibición sobre el crecimiento poblacional de la microalga *P. subcapitata*, luego de que las células algales han sido expuestas 72 h, a diversas concentraciones de las nanopartículas. Adicionalmente se realizaron observaciones sobre la estructura y distribución de las algas, así como la medición de la talla celular de estas mismas, con el fin de identificar otros indicadores relevantes de efecto.

Los resultados mostraron que la inhibición del crecimiento poblacional de las algas, así como los cambios en la talla celular individual, este último considerado un nuevo indicador, fueron los principales rasgos de alteración asociados a la exposición a las nanopartículas de grafeno y silicio, a partir de los cuales puede ser posible inferir el peligro o riesgo ambiental que representan estos nanomateriales.

Respecto a la inhibición del crecimiento celular de *P. subcapitata*, se encontró que la concentración inhibitoria al 50 % (CI_{50-72h}) asociada a la exposición de nanopartículas de grafeno y sílice, fue de 10.619 mg L⁻¹ y 12.167 mg L⁻¹, respectivamente.

Para la talla celular individual, se observó que las algas reducen su talla entre 18% y 28%, para ambos materiales y para todas las concentraciones de nanomateriales analizadas (0.74 mg L⁻¹ a 50 mg L⁻¹), la disminución de la talla tiende a presentar valores mayores de reducción a las concentraciones más elevadas.

Con base en los resultados obtenidos, la prueba de exposición con el alga *P. subcapitata* es una herramienta de utilidad que podría formar parte de una batería de pruebas, para la evaluación de efectos asociados a nanomateriales, considerando como indicadores de utilidad tanto el efecto inhibitorio del crecimiento poblacional como en la reducción del tamaño celular, con el fin de discernir aquellos materiales inocuos al ambiente de otros que representen algún peligro a los ecosistemas.

ABSTRACT

Nanostructured materials can often be found in a wide range of products given their growing application in different industrial fields such as electronics, computers, pharmaceuticals, cosmetics and the manufacture of paints, among others. This generates the possibility of finding these nanomaterials in the environment and new risks arise associated with the possibility of dissemination of nanostructural materials mainly in aquatic environments, whose effects on biological systems have not been studied.

In this work we evaluated the effects of silica and graphene nanomaterials on the growth and development of the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, a useful organism to generate evidence on the effects of substances in biological systems since it forms part of the primary level of the trophic chain, that intervenes in the transformation of nutrients and in the generation of the energy flow that sustains the trophic chains of natural systems.

To generate evidence on the effects of nanostructured materials, exposure tests were performed through algal growth assays with the specie *P. subcapitata*, following the method proposed by Blaise and colleagues (2000) and adapted by Pica-Granados and collaborators (2004). The test is based on the determination of the effect of inhibition on the population growth of the microalga *P. subcapitata*, after the algal cells have been exposed, for a period of 72 h, to various concentrations of the nanoparticles. Additionally, observations were made on the structure, size and distribution of the algae in order to identify other relevant indicators of effect.

The results showed that the inhibition of algae population growth, as well as changes in individual cell size, the latter considered a new indicator, were the main alteration features associated with exposure to graphene and silicon nanoparticles, starting from of which it may be possible to infer the danger or environmental risk represented by these nanomaterials.

Regarding the inhibition of the cellular growth of *P. subcapitata*, the results showed that the 50% inhibitory concentration (IC_{50-72h}) associated with the exposure of graphene and silica nanoparticles, is observed at 10,619 mg L⁻¹, and at 12,167 mg L⁻¹, respectively, and

with regard to individual cell size, it was observed that algae reduce their size between 18% and 28%, a condition that is observed for both materials and for all concentrations of nanomaterials analyzed (0.74 mg L⁻¹ at 50 mg L⁻¹), the decrease in size tends to present higher values of reduction at higher concentrations

At present the use of nanomaterials is incipient in Mexico, however the use of nanotechnology in the industry, and even in sanitation processes, is already an imminent reality that will have an accelerated rate of application. In this scenario, it is important to visualize nanomaterials as potential environmental contaminants, so it is interesting to look for elements of evaluation based on biological effects, which allow estimating their dangerousness, and serve as evidence to support the need to design preventive strategies for management and confinement, as well as restrictive guidelines for environmental disposal, elements that are currently non-existent even at the international level. In this sense and observing the results obtained, it can be said that the exposure test with *P. subcapitata* algae is a useful tool that could be part of a battery of tests, for the evaluation of effects associated with nanomaterials, considering as indicators useful both the inhibitory effect of population growth and the reduction of cell size, in order to discern those materials harmless to the environment of others that represent some danger to ecosystems.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
LISTA DE SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS	IX
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Justificación	3
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
1.3 Hipótesis	4
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.	5
2.1 Nanomateriales	5
2.1.1 Usos y aplicaciones de los materiales nanoestructurados	7
2.1.2 Materiales nanoestructurados en el ambiente	9
2.1.3 Posibles riesgos a la salud humana	11
2.2 Particularidades de nanomateriales de carbono y grafeno	13
2.3 Particularidades de nanopartículas de sílice	15
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES.	17
3.1 Nanomateriales en México	17
3.1.1 Regulación de los nanomateriales	18
3.2 Grafeno: Efectos al ambiente y posibles riesgos a la salud humana	20
3.2.1 Efectos ambientales	20
3.2.2 Posibles riesgos a la salud humana	22
3.3 Nanopartículas de sílice: Efectos al ambiente y posibles riesgos a la salud	24
3.3.1 Efectos al ambiente	24
3.3.2 Posibles riesgos a la salud humana	25
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	26
4.1 Preparación del cultivo algal	27
4.2 Preparación del inóculo algal para el desarrollo de las pruebas	27
4.3 Preparación de concentraciones de prueba de nanopartículas de grafeno y sílice	28
4.4 Prueba de inhibición de crecimiento algal y medición de la talla celular	28

CAPÍTULO 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	30
5.1 Inhibición del crecimiento algal	30
5.2 Talla celular del alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	38
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	45
ANEXOS	52
Anexo A Densidad algal, porcentaje de inhibición y cálculo de la CI_{50-72h}	52
Anexo B Resultados de diámetro celular algal individual	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Escala de tamaños de algunas nanopartículas (Linás et al., 2013).	6
Figura 2	El grafeno y sus formas gráficas (Geim, 2007).	14
Figura 3	Oxidación ácida del grafeno (Caballero, 2015).	15
Figura 4	Metodología para el sistema experimental.	26
Figura 5	Agregado de nanopartículas de grafeno.	32
Figura 6	A: aglomeración de grafeno en una zona de la cámara Neubauer junto a una célula de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . B: células de <i>P. subcapitata</i> expuestas a nanopartículas de sílice, donde se observa que este nanomaterial no forma aglomeraciones considerables a diferencia del grafeno.	33
Figura 7	Curva Concentración–Efecto para <i>P. subcapitata</i> expuesta a partículas de silicio de 9.4 nm.	34
Figura 8	Relación de la toxicidad (Cl _{20-72h}) en función del incremento del tamaño de las partículas. Datos obtenidos de este estudio y de Van Hoecke et al., (2008).	35
Figura 9	Efecto inhibitorio de nanopartículas de grafeno en el crecimiento celular de la microalga <i>P. subcapitata</i> .	36
Figura 10	Efecto inhibitorio de nanopartículas de sílice en el crecimiento celular de la microalga <i>P. subcapitata</i> .	37
Figura 11	Comportamiento del diámetro celular promedio de <i>P. subcapitata</i> , expuestas a diferentes concentraciones de grafeno y nanopartículas de sílice.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Instituciones y centros académicos relacionados con investigación en nanociencia y nanotecnologías (Mendoza, 2017).	17
Tabla 2	Inhibición Poblacional media (CI_{50-72h}) para grafeno y nanopartículas de sílice.	31
Tabla 3	Efecto en la talla celular (diámetro celular individual) del alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> expuesta a nanopartículas de grafeno.	37
Tabla 4	Efecto en la talla celular (diámetro celular individual) del alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> expuesta a nanopartículas de sílice.	38
Tabla 5	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> expuesta a Cu^{+2} . Resultados de efecto en la talla celular (diámetro celular individual).	39

LISTA DE SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS

m	Metro
cm	Centímetro
μm	Micrómetro
nm	Nanómetros
m²	Metro cuadrado
cm²	Centímetro cuadrado
mL	Mililitro
g	Gramos
K	Kelvin
°C	Grados Celsius
kJ	Kilojulio
MPa	Megapascuales
W	Watts
S	Siemens
h	Horas
CI	Concentración de Inhibición del crecimiento poblacional algal
NMX	Normas Mexicanas
AFNOR	Asociación Francesa de Normalización

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

El interés del hombre por transformar el entorno y tecnificar tanto las actividades industriales como las cotidianas implica el reto de optimizar los recursos energéticos a través de materiales que sean mejores conductores o con nuevas propiedades útiles para la diversificación de nuevas tecnologías en todos los campos del quehacer humano. Derivado de esto, surge la nanotecnología como una fuente de desarrollo capaz de satisfacer dichos objetivos.

Los materiales nanoestructurados conocidos como nanomateriales son materiales que tienen un tamaño aproximado de 1-100 nm (Díaz Del Castillo, 2012). En la naturaleza se producen por vulcanismo, sin embargo, actualmente la mayor parte de ellos son producidos por el ser humano, tal es el caso de los generados por la combustión de motores, o los fabricados para su uso en diferentes campos industriales como la de pinturas, la electrónica, la computación, en la farmacéutica y cosmética, así como en disciplinas como la medicina, entre otros.

El desarrollo de la nanotecnología y su aplicación en la ciencia se vislumbran como un elemento que generará grandes avances y transformará la forma de vida, sin embargo, con ello también surgen nuevos riesgos contaminantes asociados a la posibilidad de diseminación de materiales nanoestructurados en el ambiente cuyos efectos en los sistemas biológicos aún son desconocidos.

La presente investigación pretende generar evidencias sobre los posibles efectos que los nanomateriales pueden tener en sistemas biológicos, en especial en organismos clave como los productores primarios, quienes intervienen en la transformación de nutrientes y en la generación del flujo de energía que sostiene las cadenas tróficas de los sistemas naturales.

Las microalgas son productores primarios esenciales en los ecosistemas acuáticos, como una valiosa fuente de alimento que sostiene a los organismos herbívoros, los cuales a su vez son la base de cadenas tróficas más complejas donde se incluyen organismos como los peces e invertebrados. Si bien su tamaño es por lo regular menor a 40 μm , las algas

proveen la mitad de la producción primaria mundial y contribuyen, junto con los bosques y selvas, a la producción del oxígeno atmosférico y también a la producción de oxígeno disuelto en los cuerpos de agua creando condiciones óptimas para la vida en estos ecosistemas (Lai, Hou, et al., 2009).

Debido a su importancia en el sostenimiento de cadenas tróficas, en la producción de gases importantes para la vida y a su sensibilidad a los agentes contaminantes de origen antropogénico que se han constituido como una de las principales amenazas para la sostenibilidad de los ecosistemas, las algas ocupan un lugar prioritario en estudios eco toxicológicos (Auroja, 2011).

Pseudokirchneriella subcapitata, es una microalga verde (clorofita) unicelular, no colonial, con forma de media luna que tiene un diámetro entre 8 y 14 μm , y un ancho entre 2 y 3 μm (Beecher, 2013) y se encuentra en sistemas acuáticos interiores, eutróficos u oligotróficos. *Pseudokirchneriella subcapitata* se usa comúnmente como un organismo indicador útil en la evaluación de contaminación por sustancias tóxicas y nutrientes en ambientes acuáticos y suele ser utilizada como parte de una batería para estimar el potencial de fitotoxicidad de aguas dulces superficiales, subterráneas, aguas servidas y otro tipo de muestras líquidas, tales como elutriados o lixiviados, agua intersticial de sedimentos o cualquier compuesto puro soluble en agua. Esta especie de algas es bastante sensible a la presencia de sustancias tóxicas y tiene una distribución ubicua, lo que establece su utilidad para las pruebas toxicológicas (Ramírez y Mendoza, 2008).

Para lograr la evidencia sobre los posibles daños asociados a la exposición a nanomateriales, en esta investigación se emplearon como modelo de caso nanopartículas de grafeno y sílice y como organismo de prueba la microalga de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes conocida como *Selenastrum capricornutum*).

1.1 Justificación.

México está impulsando el uso de nanomateriales desde el 2001, el gobierno reconoce las nanotecnologías como un área estratégica en sus políticas de ciencia y tecnología, con aplicaciones en el transporte, energía, electrónica, biotecnología, ciencias de la salud, sector textil y construcción, entre otras (Záyago *et al.*, 2013; Llinàs *et al.*, 2015). El uso de estos materiales y su posible dispersión en el ambiente genera preocupación debido a los posibles efectos adversos que pueden generarse tanto en la salud del ser humano como en los ecosistemas.

Cabe destacar que la normatividad internacional que se aplica para el control de los materiales nanoestructurados es escasa y de orden optativo y a nivel nacional aún no existen elementos formales o normas aprobadas ni tampoco se cuenta con protocolos técnicos adecuados para la evaluación de sus efectos y riesgos.

Hasta el momento, las investigaciones relativas a los efectos biológicos asociados a la exposición a nanomateriales son escasos debido a que sus formas de acción son poco convencionales y requieren la búsqueda de nuevos indicadores de efecto. Los estudios reportados hasta el momento han demostrado que los nanomateriales pueden inhibir el crecimiento celular en cultivos de microalgas y también puede acumularse en tejidos pulmonares y órganos humanos y afectar la reproducción de *Daphnia magna* (Wang *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2016; Hazeem *et al.*, 2016).

Por ende, el estudio de los efectos de los nanomateriales en el medio ambiente es de importancia para poder determinar el nivel de riesgo y establecer lineamientos adecuados sobre la seguridad del almacenamiento, uso y disposición, así como Normas Técnicas y Oficiales Mexicanas para resguardar la salud humana y la protección del ambiente.

Con base en estos antecedentes y considerando la necesidad de obtener más evidencias sobre los efectos que los nanomateriales pueden generar en organismos se planteó la presente investigación utilizando como modelo de caso partículas de grafeno y sílice y como organismo de prueba la microalga de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata*.

1.2 Objetivos.

1.2.1 Objetivo general.

Determinar los efectos biológicos de las nanopartículas de grafeno y sílice en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

1.2.2 Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto las nanopartículas de grafeno y sílice en la inhibición del crecimiento poblacional de las microalgas, empleando como organismo modelo a la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.
- Identificar nuevos indicadores de efecto asociados a la exposición de nanomateriales.

1.3 Hipótesis.

Las propiedades fisicoquímicas, el tamaño y el comportamiento de las nanopartículas de grafeno y sílice son capaces de afectar la sobrevivencia de las microalgas, así como procesos biológicos fundamentales y el desarrollo de sus poblaciones.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Nanomateriales.

Los nanomateriales son aquellos materiales en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en el rango de la nanoescala, a pesar del hecho de que no hay una medida establecida sobre el tamaño mínimo o máximo de un nanomaterial, los antecedentes limitan su tamaño a 1-100 nm (Díaz Del Castillo, 2012). Las partículas de tamaño nano siempre han existido en la naturaleza, como en la ceniza volcánica, en el humo de incendios, en las nubes, en el polvo, etc. También hay nanopartículas que son resultado secundario y/o involuntario de procesos de producción humanos, como las que aparecen en la combustión de motores o en el asbesto o el cuarzo (Foladori *et al.*, 2013).

La nanociencia y la nanotecnología se enfocan a la producción voluntaria de nanopartículas y constituyen un campo interdisciplinario que incluye el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales que posean al menos una dimensión espacial en el rango de los nanómetros, en estos tamaños los materiales son dotados con nuevas propiedades y características (Romero, 2017)

En la Figura 1 se muestra una comparación de los tamaños de una molécula de agua y una célula con diversos tamaños de nanopartículas, en donde las nanopartículas poseen un tamaño comprendido entre el de pequeñas proteínas y los virus (Llinàs *et al.*, 2015).

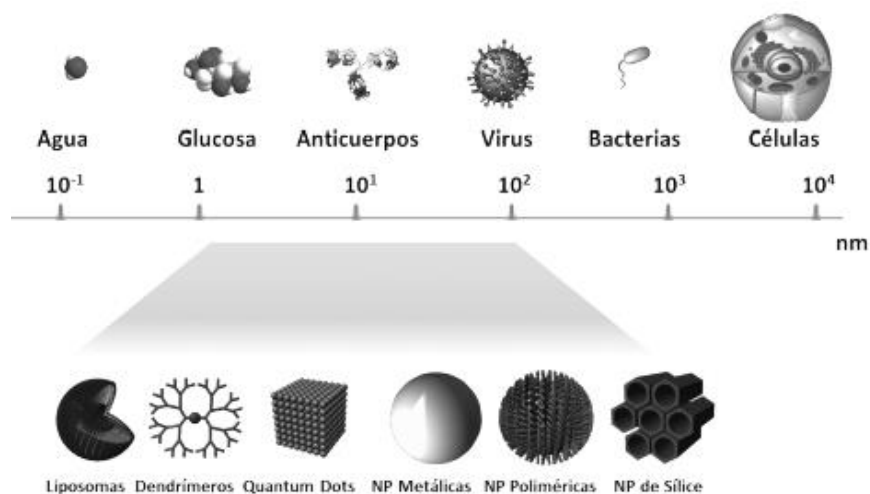


Figura 1. Escala de tamaños de algunas nanopartículas situadas en la parte de abajo (Llinás *et al.*, 2013).

Existen diferentes tipos de nanomateriales, entre ellos los más estudiados son los basados en metales y carbono, dendrímeros y compuestos. Los nanomateriales basados en metales incluyen oro, plata, cobre y óxidos metálicos. Los dendrímeros se basan en polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas, por otro lado, los compuestos combinan las nanopartículas con otras nanopartículas o con materiales de mayor tamaño. Por último, los que son basados en el carbono están contruidos por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides (fullerenos) o tubos, los cuales son conocidos como nanotubos de carbono (Díaz Del Castillo, 2012). Los nanomateriales han originado numerosas investigaciones, esto se debe en gran medida a que las inusuales propiedades asociadas a cada uno de estos nanomateriales han creado numerosas expectativas en cuanto a sus posibles aplicaciones.

Algunos de los nanomateriales se pueden crear de forma natural en el ambiente, pero la fabricación a gran escala de nanomateriales comenzó en 1985 después de que Kroto y sus colaboradores descubrieran las partículas de fullerenos e Iijima en 1991 informara de la existencia de los nanotubos de carbono. En el año 2001, Estados Unidos lanzó la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (National Nanotechnology Initiative, NNI) para coordinar las investigaciones y el desarrollo de nanotecnologías a fin de mantenerse competitivos en este campo en crecimiento. Actualmente la nanotecnología es una

industria donde se generan bastantes recursos económicos (NNI, 2011). En el mercado actual existen varios productos que contienen nanomateriales, desde productos médicos hasta cosméticos cotidianos. Los nanomateriales realmente se han integrado a la vida cotidiana.

Los métodos de síntesis de nanoestructuras pueden clasificarse de acuerdo a la forma en que se alcance la escala nanométrica, las cuales son: aproximación de arriba hacia abajo (top-down) y aproximación de abajo hacia arriba (bottom-up). La aproximación arriba hacia abajo (top-down) involucra principalmente métodos físicos que describen la evaporación térmica, la implantación de iones, el depósito químico en fase vapor y la molienda o activación mecanoquímica. Por otro lado, la aproximación de abajo hacia arriba (bottom-up) involucra principalmente métodos químicos, como el método coloidal, la reducción y la irradiación con microondas, son algunos ejemplos (Zanella, 2012).

2.1.1 Usos y aplicaciones de los materiales nanoestructurados.

Las aplicaciones de los nanomateriales son conocidas en lo que se llama nanotecnologías, en la cual convergen varios campos que van desde la ciencia de materiales, la electrónica, la computación y hasta la medicina. Las propiedades de los materiales nanoestructurados están determinadas por su estructura a escalas micro y nanométrica, por lo que una de las claves para desarrollar materiales de nueva generación es la habilidad de controlar su estructura a escalas cada vez más pequeñas (Mendoza *et al.*, 2007).

Los nanomateriales son utilizados para fabricar objetos útiles para la vida cotidiana, la cual siempre ha tenido un alto valor social y económico, por ejemplo, el acero y materiales poliméricos. De igual forma se desarrollan tecnologías como la purificación del agua que utiliza filtros porosos desarrollados a escalas nanométricas y utilizando materiales nanoestructurados, los cuales pueden eliminar el 100% de virus y bacterias. (Medina *et al.*, 2015). Los metales nanoestructurados ofrecen una resistencia mecánica de cuatro o cinco veces mayor que los metales actualmente conocidos. Actualmente se utilizan materiales nanoestructurados en cosméticos, arcillas, recubrimientos, pinturas y herramientas de corte (Mendoza *et al.*, 2007). En el ámbito automotriz se venden vehículos con refuerzos

de frenos o piezas fabricadas con nanotubos de carbono obtenidos de los fullerenos, cien veces más resistentes que el acero y seis veces más livianos que el aluminio (Castagnino, 2006). Las llantas para vehículos de la empresa Lanxess, agregan a la materia prima nanopartículas de negro de carbón, haciéndolas más resistentes al desgaste y otorgándoles una vida útil, según dice la compañía, el 15% mayor (Foladori *et al.*, 2013).

En los campos de la electrónica y computación, las nanotecnologías se emplean en la fabricación de chips para computadora y en dispositivos para almacenamiento de datos, por ejemplo, usando nanotubos semiconductores, se desarrollan circuitos de computación con funcionamiento lógico y transistores, incrementando la velocidad, disminuyendo el consumo de energía y aumentando las prestaciones. El desarrollo de nanotransistores y nanomemorias son cruciales para absorber las crecientes e inmensas capacidades de procesamiento de datos y capacidad de memoria que demandan los desarrollos multimedia (Medina *et al.*, 2015).

Respecto a la medicina, en este campo es indispensable realizar exámenes y procedimientos de validación rigurosos antes de implementar alguna nueva tecnología, actualmente está en fase de experimentación el uso de nanopartículas para curar enfermedades genéticas como la fibrosis quística, en la misma situación se encuentran las nanopartículas magnéticas que permitirían posicionar fármacos en sitios específicos mediante sistemas de campos magnéticos externos. Algunos nanomateriales, como las nanopartículas de sílice funcionan para la encapsulación de fármacos y así éstos tengan una mayor absorción en el organismo (Jaramillo *et al.*, 2014). Entre las aplicaciones de la nanotecnología más prometedoras y dinámicas destacan las investigaciones en enfermedades como el cáncer, VIH sida, diabetes, osteoartritis, enfermedades degenerativas y desórdenes cardiovasculares y nerviosos, entre muchas otras (Delgado, 2007).

Las nanotecnologías también pueden ayudar a resolver problemas de contaminación y uso de fuentes de energía. A nivel mundial todas las empresas que dominan el negocio de los transgénicos están invirtiendo en nanotecnologías, algunas empresas promueven la creación de nanocápsulas de liberación lenta que se usarán en agentes biológicos, por

ejemplo, como fármacos, insecticidas, fungicidas, plaguicidas, herbicidas y fertilizantes (Delgado, 2009).

2.1.2 Materiales nanoestructurados en el ambiente

La nanoindustria ha abarcado un amplio sector industrial, utilizando materiales con escalas de 1 a 100 nm, los cuales ofrecen nuevas propiedades que los utilizados comúnmente. Aunque sus partículas pueden variar en tamaño, forma, superficie, composición química y persistencia biológica, en su mayoría son muy reactivos (Castagnino, 2006). Los nanomateriales se pueden liberar al medio ambiente de manera intencional o no intencional, existen algunos factores que tienen mayor influencia en la cantidad de nanomateriales liberados al medio ambiente de manera no intencional. Entre estos factores se encuentra el tipo de aplicación, el tiempo de residencia con el usuario, las posibles transformaciones físicas y químicas, así como el nivel socio económico de cada región en estudio (Keller y Lazareva, 2013).

Los nanocontaminantes se comportan de manera diferente en función de las características fisicoquímicas de los medios que las contienen. Las corrientes de agua residual son el principal medio para el transporte de nanocontaminantes en el ambiente (Ma *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que los nanocontaminantes se aglomeran una vez que se encuentran en medio acuoso, influyendo significativamente en las tasas de sedimentación y a su vez en el transporte (Keller *et al.*, 2010). Algunas investigaciones han demostrado que los principales factores con los que se relaciona la aglomeración y dispersión de los nanocontaminantes en medio acuoso incluyen condiciones como la fuerza iónica en el medio, pH, salinidad, contenido de materia orgánica (Limbach *et al.*, 2008). En cuanto al destino final, este puede ser el suelo, el aire y el agua.

Los nanomateriales se incorporan al medio ambiente por distintas vías, existe una exposición a nanopartículas potencialmente contaminantes a través del aire mediante su uso en procesos industriales, al agua a través de las aguas residuales por derrames o lavados, y en el suelo donde se pueden acumular por su uso en herbicidas, industria electrónica, neumáticos, pilas de combustible y vertido de otros productos,

desconociéndose en que pueden transformarse y por ello es necesario estudiar su distribución en los distintos sistemas ambientales.

Una de las principales interacciones del ser humano con el medio ambiente se da con el aire, de este se toma el oxígeno necesario para todas las funciones vitales y junto con el oxígeno ingresan en el organismo infinidad de partículas que se encuentran suspendidas en la atmósfera (Frejo *et al.*, 2011). El aire puede transportar las nanopartículas, debido a su ínfimo tamaño y mínimo peso, esto aumenta su probabilidad de viajar largas distancias e interactuar con otros contaminantes generando efectos indeseables sobre el medio ambiente y la salud (Biswas *et al.*, 2005). La cantidad de nanopartículas en el aire es similar en las zonas urbanas y rurales, encontrándose entre 10^6 a 10^8 nanopartículas por litro de aire. En las zonas rurales en su mayoría proceden de la oxidación de compuestos volátiles de origen biogénico o antropogénico, incluidos los aerosoles orgánicos. En las zonas urbanas, las principales son los motores diésel y los procesos de foto oxidación (Schneider *et al.*, 2005).

Debido al aumento de la superficie específica y reactividad de las nanopartículas, se produce un aumento de su biodisponibilidad y toxicidad, por ejemplo, las nanopartículas de CuO son hasta 50 veces más tóxicas que las partículas de CuO de mayor tamaño en crustáceos, algas, protozoos y levaduras y las nanopartículas de TiO₂ y Al₂O₃ fueron casi dos veces más tóxicas que sus partículas de mayor tamaño frente a nemátodos (Frejo *et al.*, 2011).

La superficie de las nanopartículas influye en propiedades tales como estabilidad, movilidad, depósito en sistemas acuáticos, comportamiento ambiental y ecotoxicidad para las algas, plantas y hongos (Navarro *et al.*, 2008). Los sedimentos deben considerarse como un importante depósito para las nanopartículas al integrarse al medio acuático, siendo los organismos bentónicos los principales receptores de las mismas, en estudios de ecotoxicidad se ha observado que en sistemas acuáticos las nanopartículas de TiO₂ son atrapados por las algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, indicando que el TiO₂ redujo la luz disponible para las algas provocando una inhibición en su crecimiento (Aruoja *et al.*, 2009).

El destino de las nanopartículas en el suelo es uno de los campos de investigación medioambiental menos desarrollada, se han presentado casos que señalan una posible toxicidad de las nanopartículas sobre diversas bacterias del suelo, por ejemplo, las nanopartículas de plata (AgNPs) y nanotubos de óxido de titanio (TiO₂NTs) (Conbatt, 2013). Pero existen algunos nanomateriales que se utilizan en procesos de descontaminación y regeneración de suelos, como las nanopartículas de hierro elemental, debido a que sus propiedades hacen que reaccionen eficientemente con los compuestos contaminantes del suelo degradándolos hasta hacerlos menos peligrosos, permitiendo una mayor eficiencia y rapidez en los procesos de descontaminación (Frejo *et al.*, 2011).

2.1.3 Posibles riesgos a la salud humana

Actualmente se sigue ignorando el impacto nano sobre la salud; la célula es un ámbito nano, a nivel del núcleo, de las mitocondrias y del retículo endoplásmico, donde estos materiales pueden actuar (Castagnino, 2006). Hasta hace unos años era común escuchar el argumento de que no había pruebas en las cuales las partículas nanomanufacturadas ofrecían riesgo de toxicidad al ser humano y otros seres vivos. Sin embargo, poco a poco, se ha acumulado una gran cantidad de artículos científicos que sugieren que varias nanopartículas tienen propiedades tóxicas y, por lo tanto, requieren de un manejo adecuado (Foladori *et al.*, 2017).

Los mecanismos de toxicidad tras la exposición a nanopartículas son complejos y dependen de la vía de exposición, dosis, respuesta del organismo, susceptibilidad y propiedades fisicoquímicas específicas de las partículas (Hoet *et al.*, 2004). La absorción de nanopartículas se produce a través de las tres principales vías de entrada, las cuales son los pulmones, piel y el aparato digestivo. Las propiedades de óxido reducción en los diferentes tejidos pueden ser desde muy oxidantes, como sucede en la piel o en los pulmones, hasta muy reductoras, en el intestino esto puede afectar a los mecanismos que desencadenan el estrés oxidativo, por lo cual es necesario estudiar todos los sistemas del organismo a los que pueden llegar (Frejo *et al.*, 2011).

Los nanomateriales son inhalados dependiendo de su tamaño, forma y composición química, siendo capaces de penetrar y depositarse en los diferentes compartimentos del aparato respiratorio, en la región extratorácica, la región traqueo-bronquial y la región alveolar. Las partículas ultrafinas superiores a 10 nm se depositan mayoritariamente en la región alveolar y las inferiores a 10 nm se depositan principalmente en la región extratorácica y en una menor cantidad en la región traqueo bronquial (Rosell y Senovilla, 2008). Una vez que las nanopartículas entran en los espacios intersticiales son captadas por las células alveolares induciendo efectos tóxicos debido a la formación de especies reactivas de oxígeno, lo que da lugar a alteraciones en el ADN e inflamación lo que desencadena fibrosis y neumoconiosis (Frejo *et al.*, 2011).

Las nanopartículas llegan a la piel a través del aire y por el uso de cosméticos y cremas solares que los contienen. No se han descrito efectos específicos para la salud, aunque hay que tener en cuenta que, dado la penetración directa a través de la piel ha estado descrita para partículas con un diámetro de 1000 nm (1 μ m), es razonable pensar que las nanopartículas penetrarán con mayor facilidad (Rosell y Senovilla, 2008). Estudios sugieren que penetran a través de los folículos pilosos, donde los constituyentes de las partículas pueden disolverse en condiciones acuosas y penetrar (Nohynek *et al.*, 2007). No existen estudios que concluyan sobre el daño que pueden ejercer las nanopartículas a través de la piel, aunque hay dos claras tendencias; autores opinan que las nanopartículas pueden ocasionar daños cutáneos, como las partículas de óxido de titanio que pueden inducir daño en el ADN (Frejo *et al.*, 2011).

Los nanomateriales pueden ser ingeridos en el tracto gastrointestinal a través de los alimentos, incluyendo al agua o de forma indirecta a través del suministro de medicamentos (El-Ansary *et al.*, 2009). Existen pocos estudios sobre la absorción y disposición de nanomateriales por el tracto gastrointestinal y la mayoría han demostrado que los nanomateriales se eliminan rápidamente, sugiriendo que las células epiteliales del intestino delgado son capaces de absorber nanopartículas con tamaño <200 nm (Frejo *et al.*, 2011).

2.2 Particularidades de nanomateriales de carbono y grafeno

Los nanomateriales de carbono son una de las familias más importantes dentro de los materiales nanométricos. Los principales materiales dentro de esta familia son los fullerenos, los nanotubos y el grafeno, cuya composición es exactamente la misma (en átomos de carbono) pero difieren en apariencia y características. El material de carbono más recientemente descubierto ha sido el grafeno. En 2004, Geim y Novoselov reportaron la preparación de grafeno mediante exfoliación mecánica del grafito (Premio Nobel de Física en 2010).

La lámina de grafeno se define como una única lámina (bidimensional) de grafito (tridimensional), de tamaño finito, con una multitud de átomos de carbono que presentan enlaces con altos estados energéticos. Por todo ello, es el material de partida ideal para originar estas estructuras como los nanotubos de carbono, los cuales presentan estructuras que se pueden construir a partir de una lámina de grafeno (López, 2009).

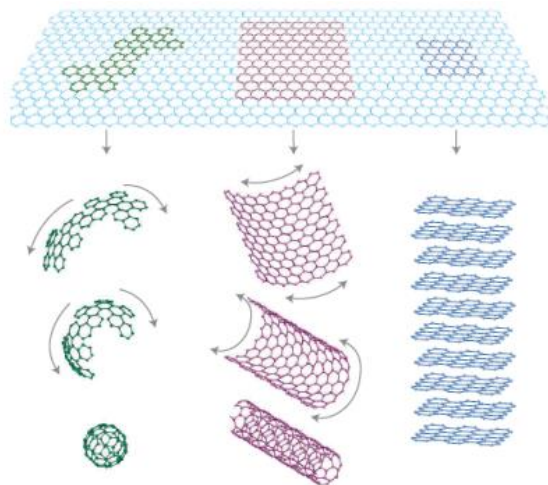


Figura 2. La estructura del grafeno es la base de todas las formas gráficas encontradas desde 1985. Puede envolverse formando los fullerenos, enrollarse generando los nanotubos de carbono o apilarse conformando el grafito (Geim, 2007).

Las propiedades del grafeno lo hacen un material idóneo para múltiples aplicaciones en tecnología, sobre todo en electrónica, permitiendo fabricar dispositivos electrónicos mucho más pequeños que cualquiera de los que existen actualmente, destacando su aplicación en la fabricación de circuitos integrados. Se supone que las características del grafeno pueden hacer posible construir procesadores mucho más rápidos que los actuales. El grafeno ha sido objeto de estudio durante estos años, ya que presenta propiedades físicas y químicas únicas comparadas con otros materiales de carbono de gran aplicación en áreas como la electrónica, química o electroquímica, entre las que destacan: alta conductividad térmica (3080 - 5150 (W/(m·K)) y eléctrica (200 S/m), excelente estabilidad térmica con una temperatura de resistencia a la oxidación de hasta 601 °C, alta elasticidad y dureza, elevada área superficial (2600 cm²/g), alta resistencia mecánica (200 veces mayor que la del acero), puede reaccionar químicamente con otras sustancias para formar compuestos con diferentes propiedades, es muy ligero y flexible y posee propiedades fotoeléctricas (Caballero, 2015).

El óxido de grafeno es un material empleado como precursor para la fabricación en serie de materiales basados en grafeno, se obtiene tras el tratamiento del grafito con oxidantes fuertes, manteniendo las mismas propiedades del grafeno (Marcano, 2010 y Mao, 2012). El método Hummers (Figura 3) es el procedimiento más utilizado para la obtención del óxido de grafeno y se basa en el tratamiento del grafito con KMnO₄ y H₂SO₄ concentrado, en presencia de NaNO₃.

El óxido de grafeno se puede dispersar en agua en un orden de 1-4 mg/mL, hecho que se explica en base a la absorción de las moléculas de agua en la superficie de los planos laminares mediante enlaces de hidrógeno (Si, 2008). La absorción del agua junto con algún

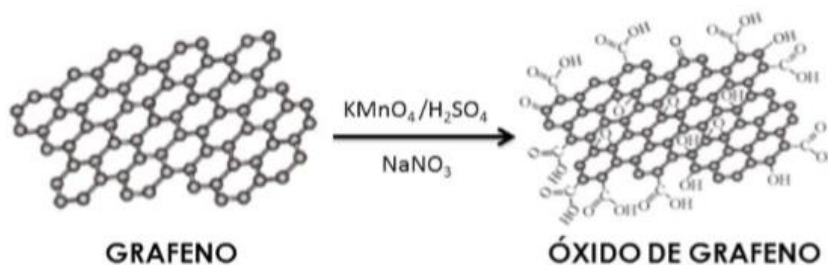


Figura 3. Oxidación ácida del grafeno mediante el método Hummers (Caballero, 2015).

tipo de grupos oxigenados como los epóxido, carbonilo, carboxilo e hidroxilo, aumentan el carácter hidrofílico del material e influyen en las características estructurales, mecánicas y electrónicas del material (Caballero, 2015). El óxido de grafeno también puede ser dispersado en disolventes orgánicos como el dihidrofurano, N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, o-xilano y etilenglicol (Dreyer, 2010).

2.3 Particularidades de nanopartículas de sílice

El silicio se aisló por primera vez y se describió como un elemento en 1824 por el químico sueco Jons Jacob Berzelius. La reacción entre sílice y carbono dentro del horno de arco eléctrico produce nanopartículas de sílice (SiO_2) (Nandanwar *et al.*, 2013). El tamaño, la morfología y las propiedades de las nanopartículas de sílice dependen de los métodos de su fabricación. Las nanopartículas de sílice o dióxido de silicio son el mismo material utilizado para hacer vidrio; en la naturaleza, la sílice produce el cuarzo y la arena que se encuentra en las playas.

Las propiedades físicas y químicas en las cuales destaca la sílice y sus nanopartículas, son que generalmente se comportan como un aislante, es decir, no muestra conductividad eléctrica. Posee baja conductividad térmica y por lo tanto se destaca que es un aislante térmico natural. La sílice tiene un punto de fusión muy alto, aproximadamente $1400\text{ }^{\circ}\text{C}$, la cual varía según su estructura particular, pero el dióxido de silicio, que es un material frágil y débil, tiene un punto de fusión de $1728\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fu *et al.*, 2008). Es insoluble en agua y en disolventes orgánicos. El dióxido de silicio tiene una estructura de unión covalente muy fuerte, por lo que es un óxido muy fuerte y no se agrieta. Posee una resistencia a la tracción de unos 44 MPa y su resistencia al impacto es de 7.8 kJ/m^2 (Nandanwar *et al.*, 2013).

A diferencia de los metales como el oro y el hierro, la sílice es un mal conductor tanto de los electrones como del calor. A pesar de estas limitaciones, las nanopartículas de sílice (óxido de silicio) forman el marco de los aerogeles de sílice. Los aerogeles de sílice se componen de nanopartículas de sílice intercaladas con nanoporos llenos de aire, como resultado, esta sustancia está compuesta principalmente de aire. Debido a que el aire tiene una conductividad térmica muy baja y la sílice tiene una conductividad térmica baja, estas

propiedades hacen que estos materiales, conocidos como nano aerogeles, sean uno de los mejores aislantes térmicos conocidos por el hombre (Fernández *et al.*, 2007). Las nanopartículas de sílice son nanomateriales de gran utilidad ya que tienen la capacidad de contener, transportar y liberar sustancias biológicamente activas, por ello se utilizan en la encapsulación de algunos fármacos (Jaramillo *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES

3.1 Nanomateriales en México

Al igual que otros países, México está involucrado en el desarrollo, uso y estudio de los nanomateriales y las nanotecnologías (Tabla 1). El gobierno, desde 2001 reconoce a las nanotecnologías como un área estratégica en sus políticas de ciencia y tecnología (Záyago *et al.*, 2013). En 2002, el Instituto de Física de la UNAM, fundó por iniciativa de los investigadores, la Red de Grupos de Investigación en Nanociencia (REGINA), cuyo objetivo es promover la colaboración multidisciplinaria para generar proyectos de investigación en nanociencia optimizando el uso de recursos humanos y materiales y difundirlos (Mendoza G. *et al.*, 2007). En 2009, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), financia una Red Nacional de Nanociencia y Nanotecnología, para generar y facilitar el trabajo científico (Záyago *et al.*, 2013).

Tabla 1. Instituciones y centros académicos que realizan investigación en nanociencia y nanotecnologías, principalmente en nuevas estructuras, nanopartículas, nanopelículas y polímeros nanoestructurados (Mendoza, 2017).

Áreas de Investigación	Centros de Investigación
Nuevas estructuras	IPICYT, IPN, CIMAV, UNAM
Nanopelículas	CINVESTAV, UASLP, BUAP, CIMAV, UNAM
Polímeros nanoestructurados	CIQA, Universidad de Guanajuato, UNAM, Universidad de Guadalajara, UASLP, CINVESTAV-Qro., IMP
Nanopartículas	UNISON, UNAM, BUAP, CINVESTAV-Qro., UASLP, IPN, ICO

México se posiciona con el segundo lugar en el desarrollo de las nanotecnologías en América Latina después de Brasil y seguido por Argentina (Záyago *et al.*, 2013). Como resultado de la ausencia de una iniciativa nacional y de objetivos claros, los esfuerzos en

el estudio de nanomateriales y nanotecnología en México se encuentran dispersos y aislados. En México existen varias instituciones, laboratorios, centros de investigación y educativos, universidades e institutos que trabajan con nanotecnología. Existen cerca de 56 instituciones realizando actividades de investigación, más de 159 laboratorios y se estiman 340 líneas de investigación actualmente desarrolladas sobre nanotecnología (Záyago y Foladori, 2010).

Se calcula que hay 449 investigadores trabajando en la temática de los cuales 29% se encuentran adscritos a centros de investigación CONACyT, 18% están en la UNAM, 15% en el IMP, 8% en el IPN y 30% en otras 20 instituciones (SE, 2008).

3.1.1 Regulación de los nanomateriales.

Las nanotecnologías han supuesto un gran avance tecnológico en todos los campos, como la sanidad, industria, alimentación, entre otros, aportando grandes beneficios para consumidores, trabajadores, pacientes, industria y creación de empleos. Sin embargo, las nanotecnologías pueden exponer a las personas y al medio ambiente a nuevos riesgos que deben ser convenientemente evaluados.

México es uno de los países pioneros en Latinoamérica en investigación sobre nanomateriales, ha tratado de incorporarse a las iniciativas mundiales referente a la seguridad sobre el uso de los mismos. En 2008, en Guanajuato se llevó a cabo el National Workshop on the Responsible Development, Manufacture and Use of Nanomaterials. Este evento reunió a investigadores de todo el país, representantes de los gobiernos de los Estados Unidos y la Unión Europea, donde se comenzó a discutir sobre la regulación en el uso de nanomateriales y su riesgo potencial sobre la salud (Centro de Investigaciones en Óptica, 2008).

En el año 2010 se formó el Consejo de Alto Nivel para la Cooperación Regulatoria entre México y Estados Unidos, su plan de trabajo comprendió la creación de guías para el establecimiento de normas relacionadas con la regulación de los productos derivados de la nanotecnología. Después, fue integrado el Comité Técnico Nacional de Normalización de

las Nanotecnologías (CTNNN), que incluyó a diferentes organizaciones en el sector industrial, académico, gubernamentales, de investigación y desarrollo, entre otras. Con el propósito de iniciar el establecimiento de normas mexicanas que contemplaran las estrategias para la regulación en la producción y uso de nanomateriales en el país (Red de Nanociencias y Nanotecnología, 2008; Foladori *et al.*, 2017).

La regulación sobre la seguridad en el uso y exposición a nanomateriales como parte de nuevos productos tecnológicos y de consumo humano a nivel mundial, han generado diversas normativas que México ha adoptado para integrarse a esta labor. En el año 2015 se generaron dos proyectos de normas mexicanas (PROY-NMX-R-80004-5-SCFI-2015 y PROY-NMX-R-12901-1-SCFI-2015) obtenidos a partir de estándares internacionales, hacen referencia a la actividad biológica de diferentes tipos de nanomateriales y el riesgo sobre la exposición humana a los mismos. En el año 2016, la Secretaría de Economía publicó un aviso de consulta pública de dichos proyectos, donde buscó facilitar la interacción entre el sector académico, industrial y gubernamental, así como el público interesado, para colaborar en la revisión de ambos documentos y así comenzar su aplicación a la normativa mexicana. La declaratoria de vigencia de ambas normas se dio a conocer en el año 2017 y el uso de nanomateriales en el área médica y otras áreas de aplicación directa podrá comenzar a regularse en México (Hernández, 2017; Diario Oficial de la Federación, 2019).

México está haciendo una gran labor en integrarse al esfuerzo mundial que busca regular la creación y el uso de nanomateriales con aplicaciones diversas, el sector gubernamental necesita del apoyo en conjunto de científicos, tecnólogos y empresarios para establecer las estrategias que se requieren para asegurar la salud y bienestar de la población mexicana que se encuentre expuesta, o haga uso de productos nanotecnológicos (Hernández, 2017).

3.2 Grafeno: Efectos al ambiente y posibles riesgos a la salud humana

3.2.1 Efectos ambientales

El grafeno, óxidos de grafeno y otros materiales basados en carbono, como los nanotubos de carbono, se han introducido en todos los campos de la ciencia con amplias aplicaciones

industriales potenciales, pero su impacto en el ambiente no se entiende completamente debido a la falta de factores que caractericen la evaluación de su impacto ambiental.

Para conocer los efectos ambientales que el grafeno puede generar, se considera su impacto sobre la cadena alimentaria y las interacciones involucradas, afectando principalmente a las bacterias y algas que viven en ambientes acuáticos, organismos que son la base de la cadena alimenticia y que soportan la productividad de los invertebrados. Debido a este hecho, los crustáceos como *Daphnia magna* son los receptores finales de los efectos que los contaminantes ambientales han causado en niveles tróficos base, así como los que se generan en ellos de forma directa y que a su vez impacta en las comunidades de peces como *Danio rerio* (pez cebra), lo que hace posible un posible proceso de deterioro de la estructura trófica por lo que es de importancia determinar la toxicidad o efectos que ocurren en los distintos niveles de energía de los ecosistemas acuáticos (Jastrzebska et al., 2015).

Algunos estudios relacionados se enuncian a continuación:

Gollavelli y Ling (2012) probaron la forma en que el grafeno se incorporaba a los tejidos de embriones de *Danio rerio* (pez cebra) y así mismo su toxicidad. Las partículas de grafeno recubierto con ácido poliacrílico (PAA) y fluoresceína (FMA), fueron inyectadas en los embriones. Previamente se demostró que los materiales de recubrimiento eran biocompatibles con los peces al no inducirse anomalías ni afectar la tasa de supervivencia de los embriones de peces. Las imágenes de microscopía de escaneo láser confocal revelaron que el grafeno multifunción se localizaba solo en la región del citoplasma del embrión con una biodistribución que va de la cabeza a la cola en los peces cebra. Sobre la toxicidad de estos materiales, esta fue negativa, sin embargo, se debe tener en cuenta que el grafeno multifunción utilizado en el estudio se recubrió con PAA, lo que podría llevar a la falta de toxicidad del material.

LiQiang et al., (2012), también experimentaron con embriones de peces cebra. Sus resultados demostraron que el óxido de grafeno produce toxicidad moderada al inducir retraso en la eclosión de embriones de peces cebra a una dosis alta de 50 mg L⁻¹. Asimismo, se observaron malformaciones en la espina dorsal, en menor escala de la cola

y la degradación del cuerpo y la opacidad en la yema, rasgos asociados a apoptosis en tejidos embrionarios del pez cebra.

Mesaric *et al.*, (2013) emplearon como organismo modelo nauplios del crustáceo *Amphibalanus amphitrite*, el cual es una especie invasora. El análisis de los efectos tóxicos del grafeno, tuvo por objeto buscar estrategias de erradicación de dicha especie. Los autores encontraron que la exposición a concentraciones de grafeno de 10 a 1000 mg L⁻¹ produce desde la disminución en la velocidad natatoria de los nauplios hasta su mortalidad después de 24 y 48 h de exposición.

Pretti *et al.*, (2014) estudió la toxicidad de las nanopartículas de grafeno en organismos marinos modelo, como el alga verde unicelular *Dunaliella tertiolecta* y el crustáceo *Artemia salina*. Los autores encontraron que el grafeno era tóxico para las algas y que constituía agregados de grafeno en el intestino de *A. salina* sin producir letalidad por lo que a las concentraciones probadas no se observó toxicidad aguda, sin embargo, un experimento de exposición crónica de 48 h, reveló que el grafeno genera un patrón alterado de biomarcadores de estrés oxidativo, que resultó en un aumento significativo de la actividad de catalasa y de glutatión peroxidasa, a concentraciones de exposición de 1 mg L⁻¹.

Hazeem *et al.*, (2016) examinaron el efecto de diferentes concentraciones de óxido de grafeno en el alga *Picochlorum sp.* durante las diferentes fases de su crecimiento. Los resultados mostraron que la toxicidad del óxido de grafeno incrementa proporcionalmente a su concentración. Se encontró que la concentración más baja (0.5 mg L⁻¹) mejora el crecimiento de algas y el contenido de pigmento de *Picochlorum sp.* En contraste, la concentración más alta (5 mg L⁻¹) de óxido de grafeno tuvo una consecuencia negativa sobre el crecimiento de algas y la concentración de pigmento fotosintético.

Fan *et al.*, (2016) también evaluaron la toxicidad aguda y crónica del grafeno para *Daphnia magna*, (crustácea, cladóceros). Los resultados indicaron que el grafeno promovió el crecimiento y reproducción de las *D. magna* en concentraciones de exposición de 0.1 mg L⁻¹, mientras que a concentraciones por arriba de 1 mg L⁻¹, ambos indicadores se inhibieron.

Con base en estos antecedentes, es posible inferir que los nanomateriales basados en carbono, como el grafeno pueden causar una gran variedad de efectos adversos en diversas especies, aspecto que pone en alerta sobre los posibles peligros ambientales que se asocian a esta clase de partículas, en especial porque los nanomateriales de carbono son duraderos, resistentes a la degradación y de ser dispersados en el ambiente, tienen el potencial de permanecer en el medio durante largos periodos. Las investigaciones recién empiezan a comprender el comportamiento que estos materiales en los sistemas vivos y es indispensable avanzar en el conocimiento sobre sus efectos potenciales a nivel agudo y crónico en especies silvestres.

3.2.2 Posibles riesgos a la salud humana

Como se menciona anteriormente, existen vías por las cuales los nanomateriales pueden ingresar al cuerpo humano, las cuales son: la inhalación (pulmones), penetración por vía dérmica o por contacto (la piel y epitelios diversos) y la ingestión (el aparato digestivo), así como también puede ser por medio de inyección o implantación para aplicaciones biomédicas.

Algunos estudios relacionados abordan principalmente la problemática del grafeno como causante de alteraciones de la función pulmonar, entre ellos se enuncian los siguientes:

Wang *et al.*, (2009), así como Hu *et al.*, (2011), demostraron que el óxido de grafeno podría producir citotoxicidad en medios dependientes de la dosis y el tiempo y puede ingresar en el citoplasma y el núcleo de los fibroblastos de pulmón humano, disminuyendo la adhesión celular e induciendo la flotación celular y la apoptosis en dosis superiores a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de 24 h. Los resultados indicaron que el óxido de grafeno en una dosis inferior a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ no mostró toxicidad para las células de fibroblastos humanos, mientras que la dosis de más de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostraron una citotoxicidad obvia reflejada en la disminución de la adhesión celular o en la inducción de la apoptosis celular durante 1 a 5 días después de la siembra celular. También confirmaron que el grafeno puede entrar en los tejidos pulmonares y detenerse allí e inducir inflamación pulmonar y granulomas posteriores altamente dependientes de la dosis inyectada.

Chang *et al.*, (2011) investigaron la toxicidad del óxido de grafeno al examinar su influencia sobre la morfología, la viabilidad, la mortalidad y la integridad de la membrana de las células epiteliales de pulmón humano. Sin embargo, los resultados sugirieron que el óxido de grafeno no entró en las células y no tuvo una citotoxicidad obvia. Los autores descubrieron que el óxido de grafeno solo podía causar un ligero estrés oxidativo dependiente de la dosis en las células e inducir una ligera pérdida de la viabilidad celular incluso a la concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Dentro de los estudios efectuados para otros órganos y tejidos se encuentran:

Zhang *et al.*, (2010), demostraron que el grafeno podría inducir efectos citotóxicos y lesiones mitocondriales en células neuronales humanas después de 4 y 24 h en una dosis de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los efectos observados fueron dependientes de la concentración y la forma. Curiosamente, a bajas concentraciones, el grafeno indujo una actividad metabólica más fuerte que los nanotubos de carbono, sin embargo, se revirtió a concentraciones más altas. Además, la activación de la caspasa 3, dependiente del tiempo de exposición al grafeno ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), puso en evidencia la apoptosis de las células neuronales.

Gollavelli y Ling (2012) estudiaron la citotoxicidad *in vitro* del grafeno en células de cáncer cervical humano (HeLa). Los resultados sugirieron que el grafeno exhibió toxicidad con un valor de Cl_{50} de 100 mg mL^{-1} inhibiendo el desarrollo de células cancerosas.

3.3 Nanopartículas de sílice: Efectos al ambiente y posibles riesgos a la salud humana

3.3.1 Efectos al ambiente

Los efectos ambientales de las nanopartículas de sílice se han explorado de forma relativamente escasa. El creciente interés en los efectos en ambientes naturales como en el agua dulce ha generado una base de conocimiento creciente con respecto a los efectos ecotoxicológicos.

Algunos estudios relacionados se enuncian a continuación:

Fujiwara (2008) estudió la toxicidad de las nanopartículas de sílice sobre las algas *Chorella kesslari* y descubrió que la CL₉₀ era de 0.6 mg L⁻¹ para partículas de 5 nm, de 2.8 mg L⁻¹ para partículas de 26 nm y de 4.7 mg L⁻¹ para partículas de 78 nm y concluyó que la toxicidad de estas nanopartículas aumentó cuando su tamaño disminuyó.

Duan et al., (2013), emitieron el primer reporte relacionado a los efectos de las partículas de sílice en el pez cebra (*Danio rerio*). Al emplear concentraciones de 25, 50, 100, 200 µg mL⁻¹ de partículas de sílice para exponer a los embriones de *D. rerio* durante su periodo de desarrollo (4–96 horas post fertilización (hpf)) se observaron efectos persistentes en el comportamiento de los alevines. Demostraron que la exposición de nanopartículas de sílice en el pez cebra produce embriotoxicidad con alteraciones severas de la forma de la corda lo que afecta severamente la capacidad natatoria de los alevines.

Clement et al., (2013), efectuaron estudios con crustáceo de agua dulce *Daphnia magna* y observaron que las nanopartículas de sílice de 14 nm, inmovilizan al organismo después de 72 h de exposición a una concentración de 29.7 mg L⁻¹.

Gambardella et al., (2015), estudiaron los efectos en la reproducción de erizos de mar asociados a la exposición de nanopartículas de sílice (4 a 40 nm). Las observaciones incluyeron anomalías embrionarias desde la muerte embrionaria en las primeras etapas hasta malformaciones larvales irreversibles, debido a los resultados que los autores observaron, sugieren que las pruebas de desarrollo con larvas del erizo de mar es una herramienta sensible de utilidad para la evaluación de toxicidad de nanomateriales.

Duan et al., (2013), emitieron el primer reporte relacionado a los efectos de las partículas de sílice en el pez cebra (*Danio rerio*). Al emplear concentraciones de 25, 50, 100, 200 µg mL⁻¹ de partículas de sílice para exponer a los embriones de *D. rerio* durante su periodo de desarrollo (4–96 horas post fertilización (hpf)) se observaron efectos persistentes en el comportamiento de los alevines. Demostraron que la exposición de nanopartículas de sílice en el pez cebra produce embriotoxicidad con alteraciones severas de la forma de la corda lo que afecta severamente la capacidad natatoria de los alevines.

3.3.2 Posibles riesgos a la salud humana

Los efectos en la salud humana por exposición a nanopartículas de sílice aún son poco conocidos, sin embargo, algunas evidencias basadas en las dimensiones de las partículas de sílice, sugieren que debido a su tamaño y a que poseen nuevas propiedades cinéticas y bioactividad inusual, sus efectos biológicos potenciales pueden diferir mucho de los materiales de tamaño micrométrico, en especial por exposición mediada por la inhalación.

Los estudios reportados indican que la nanosílica, tanto cristalina como amorfa es captada por las células produciendo citotoxicidad dependiente del tamaño y la dosis, aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno y estimulación proinflamatoria, esto se ha confirmado en un número limitado de estudios *in vivo*, que evidencian la inflamación pulmonar en gran parte reversible, formación de granuloma y enfisema focal sin fibrosis pulmonar progresiva (Napierska *et. al.*, 2010).

Otros estudios relacionados se enuncian a continuación:

Wang *et al.*, (2009), investigaron los efectos de las nanopartículas de sílice de 20 y 50 nm en los riñones humanos mediante el uso de cultivo de tejidos embrionarios de humano (HEK293). El ciclo celular y la apoptosis fueron los indicadores de daño evaluados. Los resultados mostraron que las nanopartículas de sílice a concentraciones de 20 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ disminuyen la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis. La concentración letal ($\text{CL}_{50-24 \text{ h}}$) fue de 80.2 ± 6.4 y $140.3 \pm 8.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para nanopartículas de sílice de 20 y 50 nm, respectivamente. Concluyeron que la exposición a nanopartículas de sílice produce citotoxicidad dependiente de la dosis en células HEK293 cultivadas, efecto que se asoció a un aumento del estrés oxidativo.

Gerloff *et al.*, (2009), emplearon una línea celular epitelial de colon humano Caco-2 exponiéndolas a nanopartículas de sílice amorfas (14 nm) que después de un periodo de exposición de 24 h causaron mortalidad celular y un daño significativo en el ADN.

Ahmad *et al.*, (2012) evidenciaron la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la exposición de células hepáticas humanas HepG2 a nanopartículas de sílice de 14 nm, que producen efectos citotóxicos a concentraciones de 25-200 mg L^{-1} asociados a la peroxidación de lípidos en estas células.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se realizó de acuerdo al diagrama señalado en la Figura 4, exponiendo a las microalgas a nanopartículas de grafeno de 7.25 nm y de sílice de 9.40 nm de tamaño, elaborando una serie de 7 distintas concentraciones que van de 0.75 a 50 mg L⁻¹ para cada uno de ellos. El análisis de los efectos asociados a la exposición a partículas de grafeno y sílice, se llevó a cabo mediante el uso de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (clorofita) la cual ha sido empleada a nivel internacional como especie subrogada para el desarrollo de pruebas toxicológicas. El alga tiene forma de media luna con un diámetro de entre 8 y 14 µm y un ancho de 2 a 3 µm (Beecher, 2013) y se encuentra en sistemas acuáticos interiores, eutróficos u oligotróficos, principalmente en ambientes de clima frío.

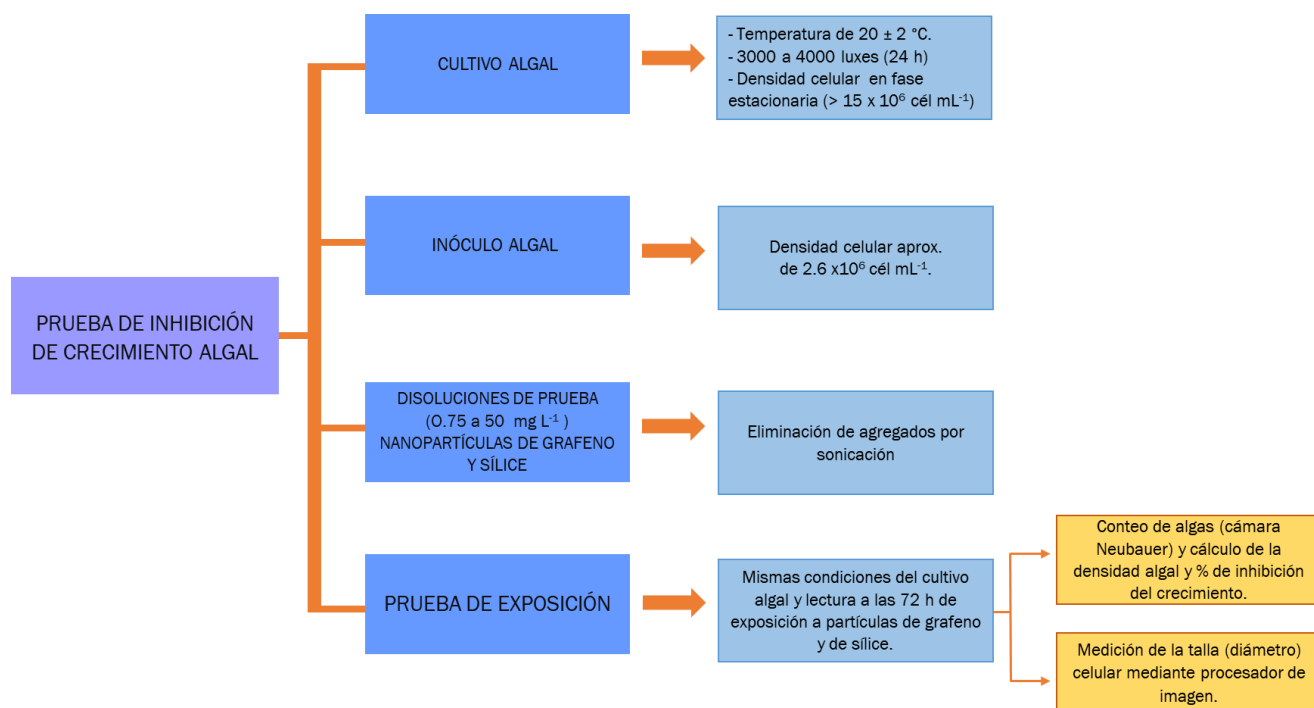


Figura 4. Metodología experimental seguida para las pruebas de inhibición de crecimiento algal

El ámbito de concentraciones se ajustó de acuerdo al grado de sensibilidad mostrado por la especie con el fin de lograr respuestas graduales que permitan la construcción adecuada de la curva concentración-efecto y la determinación de la Concentración de Inhibición

media (CI_{50}) del crecimiento poblacional del alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Asimismo, durante su cuantificación, se efectuaron observaciones adicionales para identificar anomalías de sus características físicas (forma, tamaño o color) así como de cualquier otro rasgo que pudiera surgir como un nuevo indicador de efecto asociado con la exposición a nanomateriales.

El protocolo base empleado para dicha prueba fue el método propuesto por Blaise *et al.*, (2000), adaptado por Pica-Granados *et al.*, (2004), basado en el efecto de inhibición del crecimiento poblacional de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* después de un periodo de exposición de 72 h, luego de que las células algales hayan sido expuestas a diversas concentraciones de los nanomateriales a fin de determinar su toxicidad.

4.1 Preparación del cultivo algal

Las microalgas *Pseudokirchneriella subcapitata* utilizadas para el desarrollo de las pruebas de toxicidad fueron obtenidas a partir de un cultivo de proliferación en fase exponencial con densidad aproximada de 15×10^{-6} cél mL^{-1} , preparado en medio AAP (Algae Assay Protocol, EPA 600 4-90 027). Para su proliferación, el cultivo se mantuvo a temperatura de $20^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, con una intensidad de luz blanca fría de 3000 – 4000 luxes.

4.2 Preparación del inóculo algal para el desarrollo de las pruebas

A partir del cultivo algal previo, se preparó un inóculo algal con densidad de 2.6×10^{-6} cél mL^{-1} . Para equilibrar el contenido de nutrientes en el sistema de prueba se adicionó al inóculo la mezcla de nutrientes empleada en el cultivo de proliferación pero 18 veces más concentrada (medio 18x) y una solución amortiguadora preparada con $NaHCO_3$.

4.3 Preparación de concentraciones de prueba de nanopartículas de grafeno y sílice

Los nanomateriales empleados fueron proporcionados por el laboratorio químico del Instituto de Estudios Superiores de Tamaulipas.

Las concentraciones de prueba para grafeno y sílice, fueron preparadas a partir de las mezclas de grafeno y sílice de 50 mg L⁻¹ empleando la solución amortiguadora preparada con NaHCO₃ para su aforo, estas mezclas se sonicaron durante 20 minutos para procurar la dispersión homogénea de los nanomateriales y evitar la formación de cúmulos.

El montaje de las pruebas incluyó una serie de 7 concentraciones de partículas de grafeno y de sílice (0.75, 1.55, 3. 13, 6.25, 12.50, 25 y 50 mg L⁻¹).

4.4 Prueba de inhibición de crecimiento algal y medición de la talla celular

La prueba se inició con la preparación de las concentraciones previamente señaladas, empleando viales de centelleo de vidrio borosilicato de 20 mL para su montaje. El sistema experimental consistió de cinco réplicas del control negativo y tres réplicas para el control positivo (Cu²⁺) y para cada una de las distintas concentraciones.

El control negativo se preparó adicionando 2.5 mL de la solución buffer (NaHCO₃) e inoculando 100 µL del inóculo algal de *Pseudokirchneriella subcapitata* con densidad de 2.6 x 10⁻⁶ cél mL⁻¹ en el cual también se contiene el medio nutritivo 18x que provee el adecuado desarrollo algal.

El control positivo incluyó una serie de 4 concentraciones de Cu⁺² (0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 mg L⁻¹) empleando la solución buffer (NaHCO₃) como medio de disolución e inoculando 100 µL del inóculo algal antes señalado. La solución de cobre se elaboró a partir de CuSO₄·5H₂O (CAS 7758-99-8, 100.5%). Las concentraciones del tóxico de referencia (control positivo) utilizadas fueron verificadas por métodos químicos específicos.

El sistema experimental para las pruebas con grafeno y sílice se compone de tres réplicas para cada concentración adicionando 2.5 mL en cada uno de los viales de centelleo y posteriormente adicionando el inóculo algal conteniendo el medio 18x y algas en una densidad de 2.6 x 10⁻⁶ cél mL⁻¹,

Una vez montado el sistema experimental, cada vial es cubierto con un papel duraseal transparente, agitándose manualmente cada 24 h para asegurar la distribución homogénea de las algas en todo el medio a lo largo del tiempo de exposición de 72 h.

El sistema experimental se mantuvo a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminación de 3000 – 4000 luxes, que son las mismas condiciones señaladas para la proliferación del cultivo.

Después de las 72 h de exposición se efectuó el conteo algal de cada vial con ayuda de un microscopio óptico mediante una cámara Neubauer o hemocitómetro. Efectuando los conteos de densidad y el levantamiento de registros sobre la talla color y forma, en caso de notar anomalías de dichos parámetros.

Durante fase inicial de la experimentación se identificó como una anomalía el tamaño de las células, por lo que en experimentos posteriores se procedió a medir la talla celular referida al diámetro, tomando una población de 30 células algales por cada vial, tanto de los viales conteniendo las distintas concentraciones de partículas como los correspondientes a los controles negativo y positivo. La medición se efectuó mediante una cámara Q IMAGINS acoplada al microscopio óptico y el software Image Pro Insight que proporciona la medida de la talla de cada célula algal.

La determinación de la CI_{50} se realizó a partir del análisis de la densidad algal promedio. Estos valores fueron contrastados con los obtenidos en el control negativo para obtener los porcentajes de inhibición correspondientes y posteriormente elaborar la curva concentración—efecto y determinar CI_{50} mediante el empleo del software del programa probabilístico PROBIT.

CAPÍTULO 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Inhibición del crecimiento algal

Los resultados obtenidos para las pruebas de exposición a nanomateriales de grafeno y sílice indican que ambos materiales tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, las concentraciones de inhibición medias (CI_{50-72h}) para el grafeno y sílice, obtenidas a partir de tres eventos de análisis independientes son 10.619 mg L⁻¹ y 12.167 mg L⁻¹, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de Inhibición Poblacional media (CI_{50-72h}) en mg L⁻¹ para nanopartículas de grafeno y de sílice.

	Eventos			$\bar{x}$	D.S.	CV
	1	2	3			
Grafeno	10.745	11.482	9.631	10.619	0.932	9%
Nanopartículas de sílice	12.588	12.406	11.508	12.167	0.578	5%

$\bar{x}$ = Valor Promedio D.S.= Desviación Estándar, CV= Coeficiente de variación

En lo que respecta al grafeno, existen algunos estudios previos que evalúan los efectos de que este nanomaterial genera en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, como el de Nogueira *et al.*, (2015), quienes después de trabajar un ámbito de concentraciones de prueba de 0 a 100 mg L⁻¹ determinaron que la CI_{50-96h} era de 20 mg L⁻¹, usando como indicador también la inhibición del crecimiento algal, sin embargo, utilizó un método propio que considera un medio de crecimiento distinto (AFNOR, T90-304, 1980) y un tiempo de exposición mayor, 96 h. Estas diferencias influyen en la sensibilidad de las algas y en consecuencia en los valores de la CI_{50-96h} . En el presente estudio, el valor de la CI_{50-72h} es de 10.619 mg L⁻¹ que sugiere un nivel de peligro considerable para el sostenimiento de las poblaciones microalgales. Un valor mayor, como el reportado por Nogueira *et al.*, (2015), que es el doble del encontrado en esta investigación, puede subestimar el riesgo ambiental. Es relevante hacer notar que los métodos sugeridos por Blaise *et al.*, (2000), así como la modificación efectuada por Pica-Granados *et al.*, (2004) considera que los

medios minerales de uso en la prueba además de ser oligotróficos deben contener sales que no formen complejos con metales o sustancias que pueden estar presentes en la muestra, situación que induciría interferencias al reducir la biodisponibilidad de las sustancias y cambios en los valores de la Cl_{50} , además de que son protocolos calibrados que se encuentran en procedimientos respaldados por las agencias ambientales de Canadá y EU.

El trabajo de Nogueira *et al.*, (2015) contribuye de forma relevante al conocimiento de los peligros ambientales relacionados a la posibilidad de dispersión de nanopartículas de grafeno, en especial al considerar al estrés oxidativo como la principal forma de acción de los nanomateriales y su efecto en el crecimiento poblacional de microalgas, respecto a lo cual se concluye que el efecto inhibitorio del crecimiento es significativo a concentraciones mayores a 10 mg L^{-1} como consecuencia de los daños que genera el óxido de grafeno en la membrana celular de las microalgas.

De manera similar Schwab *et al.*, (2011) observó inhibición en el crecimiento poblacional de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Pseudokirchneriella subcapitata* al exponerlas a nanotubos de carbono. Estos materiales pertenecen a la misma familia de nanomateriales producidos a partir de carbono a la que pertenece el grafeno.

Los resultados reportados por Schwab *et al.*, (2011), indicaron que la Cl_{50-72h} del crecimiento poblacional de *C. vulgaris* ocurre a una concentración de exposición de 1.8 mg L^{-1} y la de *P. subcapitata* a 20 mg L^{-1} . Al comparar los resultados previos con los obtenidos en esta investigación, se infiere que las nanopartículas de grafeno son más tóxicas para *P. subcapitata*, sin embargo para otras especies de algas como *C. vulgaris*, los nanotubos pueden resultar más tóxicas que el grafeno, lo anterior pone en evidencia que las propiedades de los nanomateriales producidos a partir de carbono pueden generar efectos deletéreos en la microflora de sistemas acuáticos.

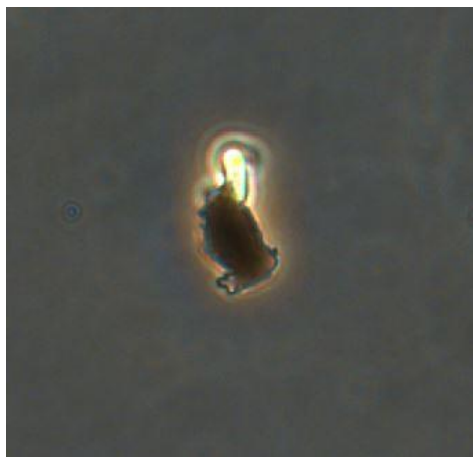


Figura 5. Agregado de nanopartículas de grafeno unidas a una célula de *Pseudokirchneriella subcapitata* observadas en este trabajo.

Adicionalmente a la idea de que el estrés oxidativo es la forma de acción principal en la generación de efectos en sistemas biológicos, Schwab *et al.*, (2011) y Nogueira *et al.*, (2015), coinciden en sugerir que la inhibición del crecimiento poblacional en algas podría estar correlacionada con efectos indirectos como el sombreado del grafeno o de los nanotubos de carbono, conocido como "efecto de sombra", ya que los autores detectaron para ambos materiales una tendencia a formar cúmulos en torno a los cuales se agregan las células algales.

En esta investigación se observó esa misma tendencia con agregados que a su vez atraen a las células algales (Figura 5 y 6A). El efecto observado sugiere que la formación de cúmulos de grafeno, puede ser un componente que contribuya al efecto inhibitorio del crecimiento poblacional al limitar la captación de fotones necesarios para la fotosíntesis, sin embargo, es posible que el fenómeno de estrés oxidativo también esté asociado.

Respecto a los resultados de la exposición de *P. subcapitata* a partículas de sílice con un diámetro de 9.4 nm en un rango de concentraciones de prueba de 0.75 a 50 mg L⁻¹, no se observaron aglomeraciones importantes de esta partícula (Figura 6B) como las observadas en las pruebas con partículas de grafeno (Figura 6A). La Cl_{50-72h} promedio obtenidas mediante 3 eventos independientes fue de 12.167 mg L⁻¹.

Algunos estudios previos asociados a la exposición a nanopartículas de sílice con *P. subcapitata* como el realizado por Van Hoecke *et al.*, (2008), reportan que la toxicidad está relacionada con el tamaño de las partículas, esto derivado de que las Cl_{20-72h} determinadas para nanopartículas de SiO_2 con diámetros de 12.5 y 27.0 nm fueron 20.0 y 28.8 mg L⁻¹, respectivamente.

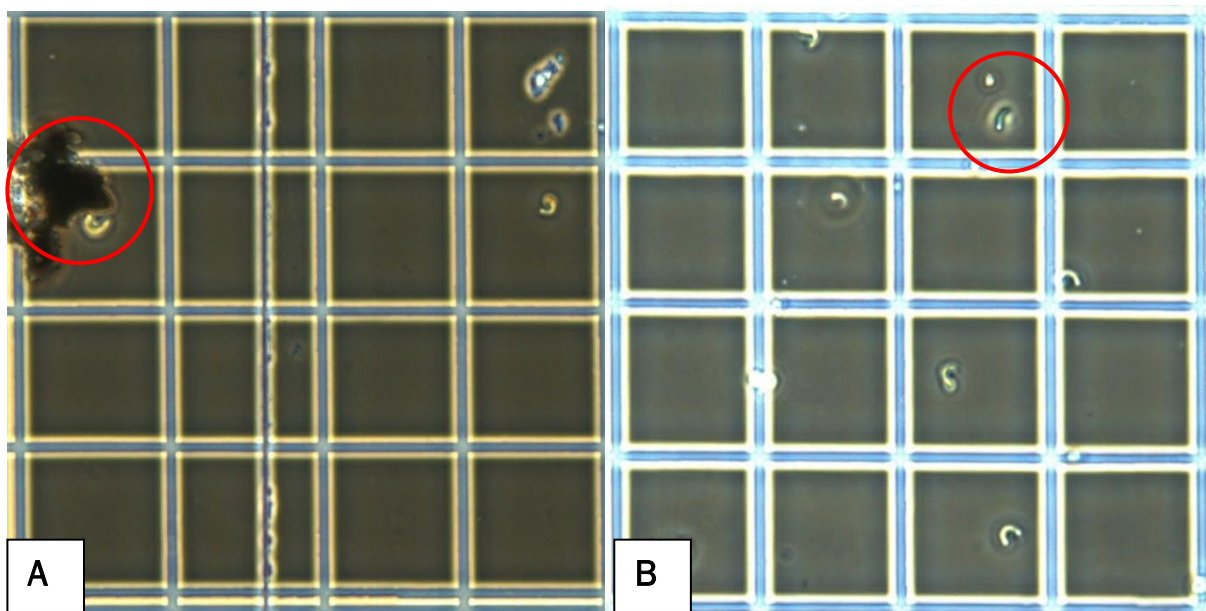


Figura 6. A: Aglomeración de grafeno en una zona de la cámara Neubauer junto a una célula de *P. subcapitata*. B: Células de *P. subcapitata* expuestas a nanopartículas de sílice, donde se observa que este nanomaterial no forma aglomeraciones considerables a diferencia del grafeno.

Otro estudio relacionado con los efectos de las nanopartículas de sílice en sistemas acuáticos es el realizado por Wei *et al.*, (2009), quien reportó que la Cl_{20-72h} para la microalga *Scenedesmus obliquus* fue de 388.1 mg L⁻¹ para partículas con tamaños entre 10 y 20 nm.

El estudio de Wei *et al.*, (2009), previamente mencionado, así como el realizado por Van Hoecke *et al.*, (2008) coinciden en atribuir la intensidad de los efectos al tamaño de la partícula y a su interacción con la pared celular de la microalga. Comparando los resultados

de estas dos investigaciones con el presente estudio, se observa similitud en el comportamiento de los datos y en conclusiones obtenidas.

Las coincidencias son relativas a la relación inversa que guarda el tamaño de las partículas con su toxicidad, es decir, que la toxicidad de las partículas de sílice será mayor conforme su tamaño se reduce.

Esto se infiere al analizar la información antecedente de Van Hoecke *et al.*, (2008) y Wei *et al.*, (2009), contrastándola con la obtenida en el presente estudio. Para el primero, el tamaño de las partículas de sílice fue de 12.5 y 27.0 nm y usaron como indicador de efecto la Cl_{20-72h} , es decir la concentración que inhibe en un 20% el crecimiento de la población algal y cuyos valores fueron 20.0 y 28.8 mg L⁻¹, respectivamente. Wei *et al.*, (2009), reportaron también la Cl_{20-72h} para un alga diferente (*Scenedesmus obliquus*), probablemente menos sensible que *P. subcapitata*, con valores que refieren menor toxicidad con 388.1 mg L⁻¹ para partículas con tamaños entre 10 y 20 nm. Para este estudio, el tamaño de partícula fue menor, de 9.4 nm y se empleó como indicador de efecto la Cl_{50-72h} , que es la concentración que inhibe en un 50 % el crecimiento de la población algal obteniéndose el valor fue 12.167 mg L⁻¹ como la Cl_{50-72h} .

Con el fin de comparar los datos de este estudio con los obtenidos por Van Hoecke *et al.*, (2008), se derivó de la curva Concentración-efecto obtenida para las partículas de sílice de 9.4 nm, el valor de la Cl_{20-72h} (Figura 7).

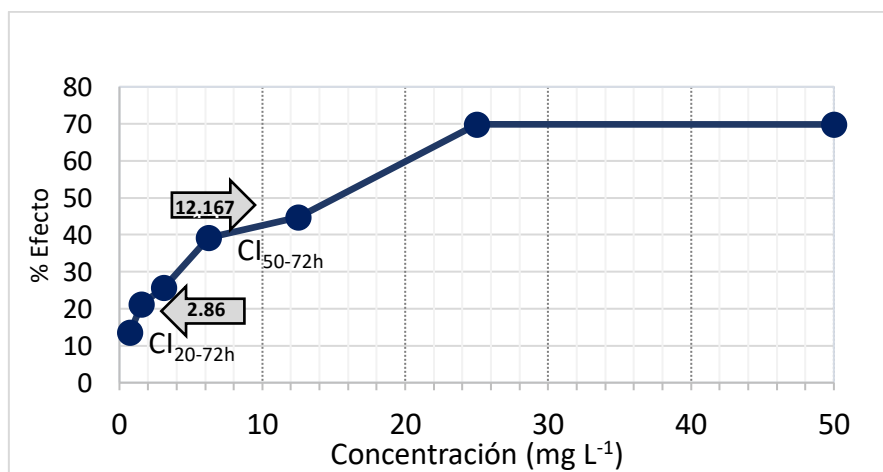


Figura 7. Curva Concentración-Efecto para *P. subcapitata* expuesta a partículas de sílice de 9.4 nm.

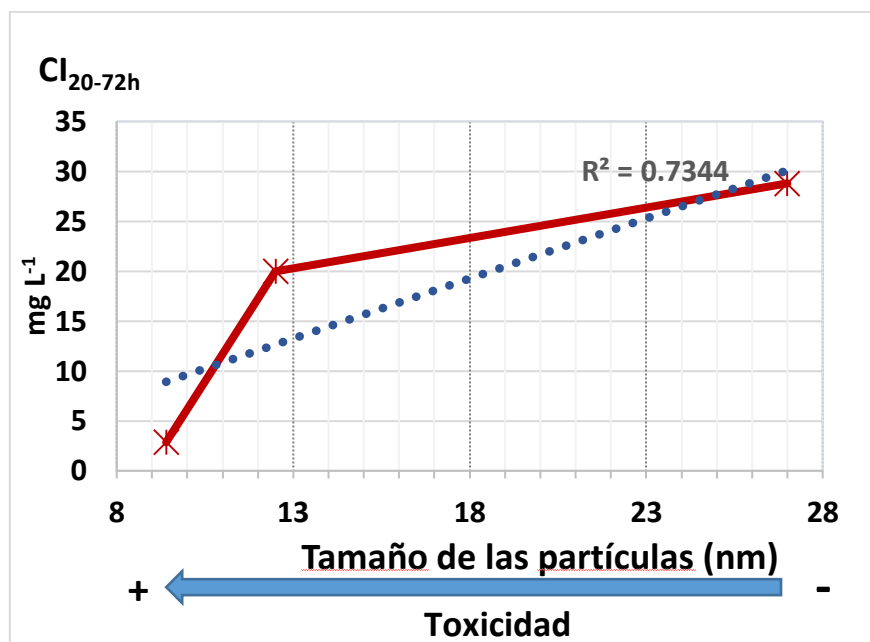


Figura 8. Relación de la toxicidad (Cl_{20-72h}) en función del incremento del tamaño de las partículas. Datos obtenidos de este estudio y de Van Hoecke *et al.*, (2008).

La tendencia de los datos de ambos estudios integrados en la Figura 8 muestra la relación que guarda el tamaño de las partículas con la toxicidad, la cual será mayor conforme el tamaño de las partículas de sílice se reduce. En este sentido se debe tener presente que cuanto más pequeño sea el valor de la Cl_{20-72h} o Cl_{50-72h} , la toxicidad de las partículas será mayor.

Por otra parte, al comparar los valores de densidad celular de *P. subcapitata* alcanzadas para las distintas concentraciones de nanomateriales probadas se observa para ambos nanomateriales un comportamiento similar (Figura 9 y 10), el cual describe el proceso de reducción de su densidad o inhibición en función del aumento de la concentración, diferencia que es significativa respecto al control para todas las concentraciones probadas.

Al comparar las curvas se observa que estas son prácticamente iguales tanto, para el grafeno que forma cúmulos, como para la sílice que se mantiene homogéneamente distribuido sin formar agregados. Lo anterior sugiere que el efecto de sombra discutido previamente como factor que pudiera contribuir a la inhibición del crecimiento celular, no

se produce diferencias en la inhibición de la densidad algal respecto al comportamiento de la sílice por lo que es factible que el fenómeno de estrés oxidativo tenga un mayor peso sobre los efectos observados.

Respecto a dicho fenómeno, Nogueira *et al.*, (2015) y Wei *et al.*, (2009) señalan que el efecto inhibitorio en el crecimiento de células algales está relacionado con la capacidad de los nanomateriales de formar especies reactivas de oxígeno (ERO). En el metabolismo aeróbico de las microalgas, al utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones se producen las ERO. El oxígeno al ser reducido se produce su forma activada singlete (O_2^1) o por la transferencia de uno, dos o tres electrones, formando el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), moléculas propagadas que se producen como consecuencia del metabolismo celular normal, y que en condiciones celulares estándar son rápidamente metabolizadas (Apel y Hirt, 2004).

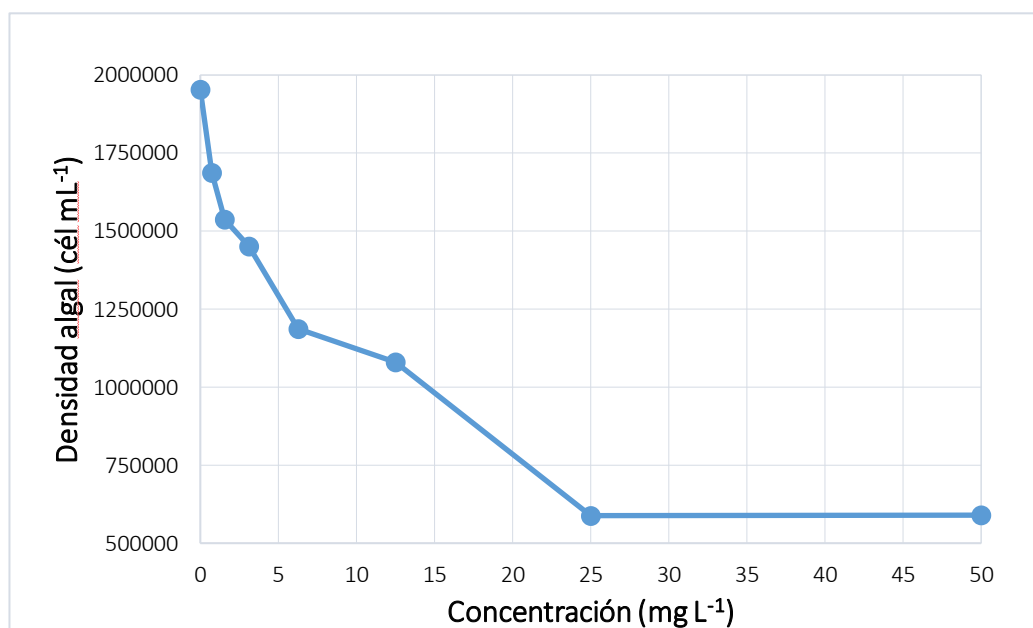


Figura 9. Efecto inhibitorio de nanopartículas de grafeno en el crecimiento celular de la microalga *P. subcapitata*.

Las microalgas continuamente producen ERO en diferentes organelos celulares como: mitocondrias, cloroplastos y en la membrana plasmática (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Las ERO son continuamente removidas por un complejo sistema antioxidante, en el que

participan enzimas y otros metabolitos. El control de los niveles de oxidantes se logra mediante la inducción de mecanismos antioxidantes de defensa que se componen de metabolitos como el ascorbato (ASC), el glutatión (GSH), el tocoferol, diversos metabolitos secundarios y los limpiadores enzimáticos de ERO como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las peroxidasas (POD), pero cuando se excede el límite de tolerancia y la capacidad para adaptarse a las moléculas producidas por el estrés oxidativo, puede ocurrir daño en membranas celulares, daño en el ADN e inhibición en el crecimiento celular. (Lira *et al.*, 2016).

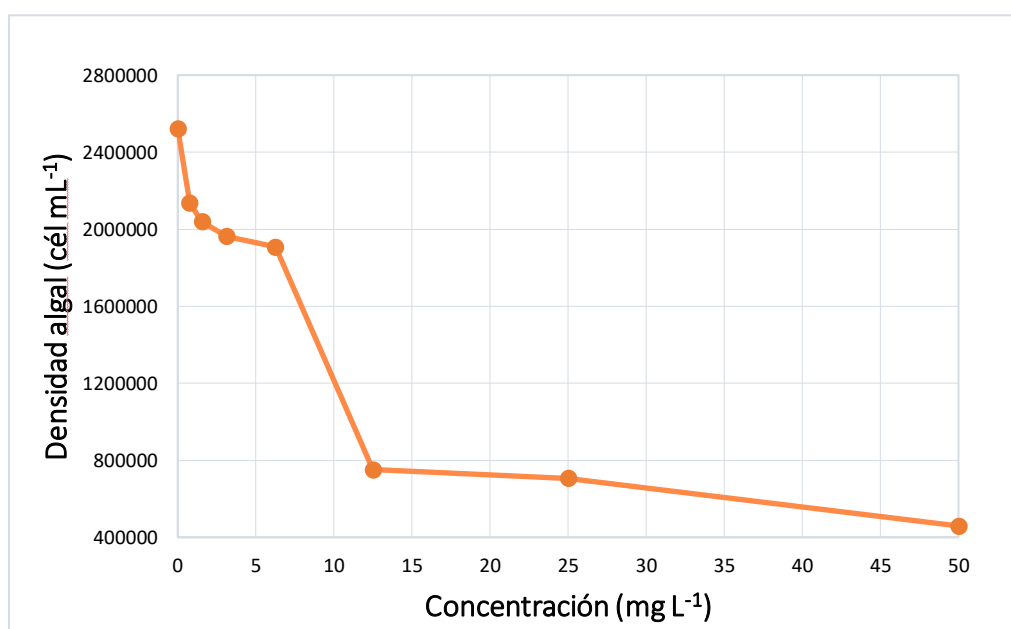


Figura 10. Efecto inhibitorio de nanopartículas de sílice en el crecimiento celular de la microalga *P. subcapitata*.

Hasta el momento no hay datos sobre la incidencia de las nanopartículas en el ambiente por lo que los valores de CI_{50} obtenidos para el grafeno y sílice no pueden ser contrastados para inferir los peligros o el riesgo ambiental asociado a estos nanomateriales, sin embargo, la información obtenida en este estudio indica que ambos materiales generan efectos biológicos en sistemas biológicos fotosintéticos. La presente investigación pretende generar información científica que contribuya al conocimiento de los efectos biológicos asociados a los nanomateriales que sean de utilidad para tomar acciones que eviten o mitiguen el peligro o riesgo ambiental en caso de su dispersión en el ambiente.

Conocer los efectos y las concentraciones en las que estos comienzan a manifestarse, permiten generar estrategias para su control, ya sea de confinamiento o de manejo de estos nanomateriales, a fin de evitar daños a la diversidad biológica de ecosistemas acuáticos y en especial a la productividad primaria de los mismos.

5.2 Talla celular del alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Los resultados obtenidos en la medición de la talla celular al finalizar las 72 h de exposición de *Pseudokirchneriella subcapitata* a nanopartículas de grafeno y sílice, se resumen en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Efecto en la talla celular (diámetro celular individual) del alga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a nanopartículas de grafeno.

Concentración (mg L ⁻¹)	Eventos			$\bar{X}$	Talla celular (μm)	D.S.	CV	% Reducción de talla
	1	2	3					
Talla celular (μm)								
Control	10.62	9.76	9.24	9.87	0.697	7.061	0.000	
0.75	8.14	8.10	8.00	8.08	0.073	0.900	18.136	
1.55	7.19	7.71	7.24	7.38	0.290	3.924	25.228	
3.13	7.24	7.81	7.62	7.56	0.291	3.851	23.404	
6.25	8.19	7.24	7.00	7.48	0.630	8.426	24.215	
12.5	7.57	7.14	6.62	7.11	0.477	6.708	27.964	
25	7.48	7.24	7.48	7.40	0.137	1.858	25.025	
50	7.57	7.10	7.14	7.27	0.262	3.608	26.342	

$\bar{x}$ = Valor Promedio, D.S.= Desviación Estándar, CV= Coeficiente de variación

Para ambos nanomateriales (grafeno y sílice), se observó que la talla promedio regular de las algas en el control negativo fue 9.87 a 10.17 μm, medida que corresponde al ámbito de talla promedio reportado para esta especie (8 a 14 μm). A partir de la concentración más baja (0.75 mg L⁻¹) empleada en el desarrollo de pruebas se observa una reducción del tamaño respecto al control negativo del 18.14 % para grafeno y del 22.42% para sílice con tamaños que se mantienen muy cercanos al límite de 8 μm, sin embargo, a partir de la concentración de 1.55 mg L⁻¹ y hasta 50 mg L⁻¹, la talla se reduce aún más (18.40% a

28.22%) con medidas por debajo del mínimo observado para esta especie para la mayoría de los casos (de 7.11. a 7.56 μm para el grafeno y de 7.3 a 8.29 μm para el sílice).

Con base en el análisis estadístico de los datos ($p=0.05$, t-student) (Anexo B), se puede comprobar que las diferencias observadas en las tallas de las células de *P. subcapitata*, para todas las concentraciones de prueba (ámbito 0.75–50 mg L^{-1}) respecto a las observadas en el control negativo, son significativas para ambos materiales.

Tabla 4. Efecto en la talla celular (diámetro celular individual) del alga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a nanopartículas de sílice.

Concentración mg L ⁻¹	Eventos			$\bar{x}$	Talla celular (μm)	D.S.	CV	% Reducción de talla
	1	2	3					
	Talla celular (μm)							
0	10.00	10.19	10.33	10.17	0.167	1.644	0.000	
0.75	7.38	8.29	8.00	7.89	0.463	5.863	22.419	
1.55	7.81	7.57	7.43	7.60	0.192	2.531	25.270	
3.13	8.43	8.10	8.33	8.29	0.172	2.072	18.486	
6.25	8.05	7.67	7.62	7.78	0.235	3.020	23.500	
12.5	7.90	7.81	7.81	7.84	0.055	0.701	22.911	
25	8.14	7.67	7.95	7.92	0.240	3.026	22.124	
50	7.48	7.19	7.24	7.30	0.153	2.096	28.220	

$\bar{x}$ = Valor Promedio, D.S.= Desviación Estándar, CV= Coeficiente de variación

La reducción de la talla parece ser una condición particular asociada a la forma de acción de los nanomateriales sobre las células algales, probablemente con un fenómeno de estrés que la célula tiende a compensar perdiendo masa o también puede asociarse a efectos oxidativos que las partículas de sílice suelen generar, en este sentido, Wang y colaboradores en el año 2009 reportaron que la exposición a nanopartículas de sílice producían citotoxicidad dependiente de la dosis en células de riñón HEK293 cultivadas, efecto que asociaron a un aumento del estrés oxidativo y que es el más ampliamente documentado para nanomateriales. En ese estudio, la reducción de talla se presentó en todas las concentraciones analizadas y de forma un poco más acentuada para el grafeno (Figura 11).

La reducción de la talla de células es una manifestación de daño poco frecuente la cual se ha observado solo en casos de exposición a nanomateriales o en algas, en pruebas cuya

exposición se prolonga por más de 72 h como es el caso del trabajo de Yamagishi *et al.*, (2017) quienes reportaron que *Pseudokirchneriella subcapitata*, redujo su diámetro a 4.54 μm y 4.49 μm , al exponerla durante 120 h a dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y 3,5-diclorofenol (3,5-DCP), respectivamente.

En casos regulares de exposiciones menores a 72 h ya sea a muestras contaminadas o incluso a tóxicos como el Cu^{2+} (utilizado en este ensayo como tóxico de referencia), el efecto observado es generalmente la inhibición del crecimiento de la población y no se ha documentado previamente reducción de la talla. Con el fin de mostrar evidencia sobre esto, se presenta el comportamiento de la talla de las células expuestas a concentraciones que son capaces de generar efecto inhibitorio de la población algal en la Tabla 5. El análisis estadístico de dichos datos mostró que las diferencias de talla respecto al control ($p=0.05$, t-student) (Anexo B), no eran significativas.

Tabla 5. *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a Cu^{2+} . Resultados de efecto en la talla celular (diámetro celular individual).

Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	Eventos			$\bar{x}$ Talla celular (μm)	σ	Cv	(%)	% Reducción de Talla
	1	2	3					
	Talla celular (μm)	Talla celular (μm)	Talla celular (μm)					
0	10.62	9.76	10.00	10.13	0.442	4.369		0.000
0.02	10.57	9.62	9.33	9.84	0.648	6.587		2.903
0.03	10.90	9.71	9.81	10.14	0.662	6.522		-0.156
0.04	10.43	10.19	8.81	9.81	0.874	8.911		3.236
0.05	10.38	10.05	9.33	9.92	0.535	5.395		2.080

$\bar{x}$ = Valor Promedio, D.S.= Desviación Estándar, CV= Coeficiente de variación

En este estudio, la reducción de talla se presentó para todas las concentraciones analizadas y de forma un poco más acentuada para el grafeno (Figura 11). Adicionalmente a la posibilidad de que los materiales estén generando estrés en las células por la generación de formas reactivas de oxígeno, ya que se ha demostrado en diversas investigaciones que las nanopartículas de carbón o metálicas son capaces de producir estrés en organismos fotosintéticos como las microalgas, generando un exceso de ERO que

puede afectar a proteínas, lípidos, carbohidratos y al ADN. Las nanopartículas, especialmente en altas concentraciones alteran la eficiencia fotosintética, la fluorescencia fotoquímica y el rendimiento cuántico en organismos fotosintéticos, debido a las interacciones de estas con los fotosistemas, ya que diversos estudios demostraron que las clorofilas transfieren la energía a las nanopartículas (Olejnik *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2015). A su vez, la perturbación en la actividad fotosintética se traduce en estrés oxidativo, el cual es provocado por las nanopartículas, se ha investigado a través de técnicas que miden producción de ERO como H_2O_2 , la activación de los mecanismos de defensa enzimáticos, la peroxidación lipídica y pérdidas de electrolitos, entre las más importantes. Sin embargo, aún no se entiende completamente cómo las propiedades de los nanomateriales inducen la producción de ERO, generando un daño en la membrana de los organismos fotosintéticos y en esta investigación una reducción en la talla celular de las microalgas (Fenoglio *et al.*, 2009; McLaren *et al.*, 2009; Perreault *et al.*, 2010; Boghossian *et al.*, 2013). En el caso del grafeno, la disminución de la talla puede atribuirse también a lo que se le conoce como “efecto sombra”, producido por la tendencia del grafeno a aglomerarse y formar cúmulos lo cual evita que las células de *P. subcapitata* reciban la intensidad de luz necesaria para su crecimiento y desarrollo óptimo.

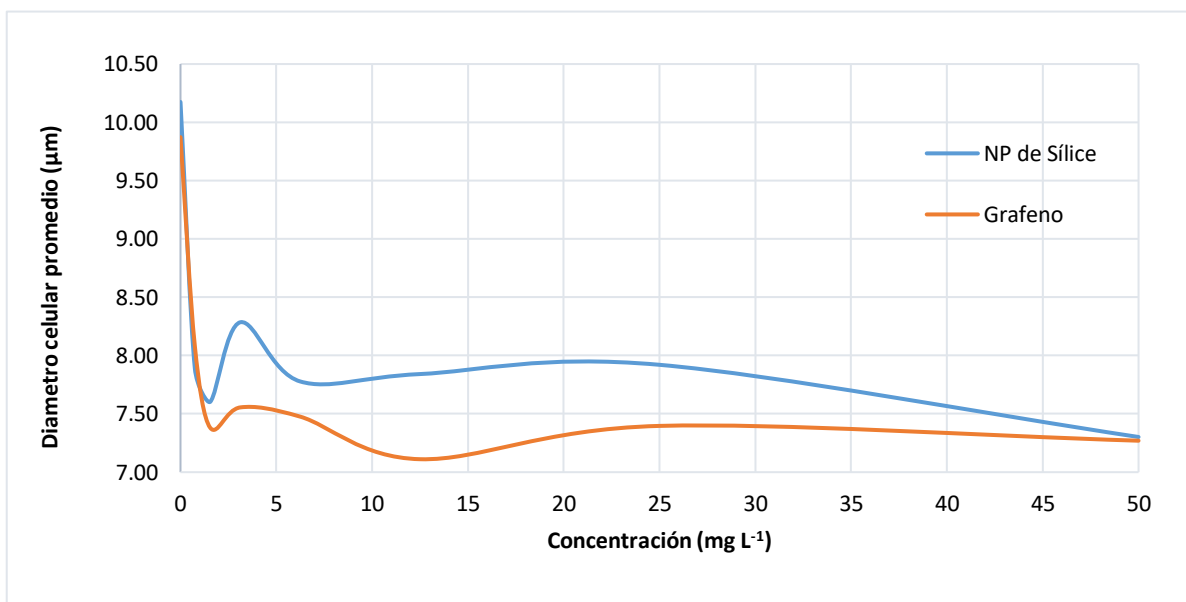


Figura 11. Comportamiento del diámetro celular promedio de *P. subcapitata*, al exponerse a diferentes concentraciones de grafeno y nanopartículas de sílice.

Las implicaciones ecológicas que puede tener el fenómeno de la reducción de la talla celular en células algales están escasamente documentadas y se requieren estudios encaminados para obtener datos concluyentes sobre este tema, sin embargo, trabajos aislados señalan que el tamaño de las algas es de importancia en las pautas de selección de la alimentación en diversas especies fitoplanctívoras como los crustáceos y cladóceros. Díaz *et al.*, (2006) reportaron información sobre los efectos que el tamaño de las microalgas representa en la tasa de ingestión de nauplios de *Artemia franciscana*, empleando dos especies de microalgas de distintos diámetros como alimento, *Chaetoceros muelleri* y *Tetraselmis suecica* con diámetros de entre 4 a 9 μm y 10 a 16 μm , respectivamente. Los autores concluyeron que los nauplios, dado su tamaño, ingieren células de las algas más pequeñas (*C. muelleri*), esto se asocia a la compatibilidad con el tamaño del nauplio y conforme crecen prefieren células más grandes que satisfagan su requerimiento energético. Considerando lo anterior, es posible que la reducción de la talla celular en algas pueda ser una limitante en el sostenimiento de poblaciones de especies fitoplanctívoras ya que si bien, pueden ser adecuadas para la alimentación de estadíos iniciales del desarrollo, conforme los organismos crecen requerirán alimentarse de insumos suficientes para mantener su biomasa y así mismo para formar reservas energéticas necesarias para la reproducción. Si las algas son de menor tamaño y en consecuencia de menor calidad alimentaria, el desarrollo y reproducción de las especies que constituyen a este nivel trófico se afectaría de forma negativa y en consecuencia se tendrían implicaciones considerables en niveles tróficos superiores.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Actualmente en México, el uso de la nanotecnología en los diversos giros industriales e incluso, en procesos de saneamiento es ya una realidad inminente que tendrá un ritmo de aplicación cada vez más acelerado. Por ello, en esta investigación de los resultados obtenidos, es importante visualizar a los nanomateriales como potenciales contaminantes ambientales, y a su vez encontrar elementos de evaluación basados en los efectos biológicos, los cuales permitan estimar la peligrosidad de estos materiales.

Los efectos observados durante las pruebas de exposición de la microalga *P. subcapitata* a nanopartículas de sílice y grafeno fueron la inhibición del crecimiento de la población algal así como la reducción de la talla celular (diámetro), los cuales se asocian a la forma de acción de los nanomateriales con la membrana de las células que por lo regular consiste en estrés oxidativo, de acuerdo a los antecedentes documentados. Por otro lado, el comportamiento de los resultados indica que la intensidad del daño o efecto está en función tanto de la concentración de los nanomateriales como del tamaño de las partículas, y que la tendencia de algunos nanomateriales, como el grafeno, de formar agregados y generar el “efecto sombra” puede ser una condición adicional que contribuye a intensificar los efectos observados.

La manifestación de los efectos observados para ambos nanomateriales y el comportamiento de los resultados nos permite inferir que las nanopartículas de silicio y grafeno, son capaces de afectar el desarrollo de las células algales y en consecuencia afectar el crecimiento de sus poblaciones, por lo que la hipótesis planteada al inicio de la investigación es aceptada.

Las pruebas de inhibición de crecimiento celular de nanopartículas con *Pseudokirchneriella subcapitata*, presentaron que la Cl_{50-72h} para nanopartículas de grafeno es de 10.619 mg L^{-1} , mientras que para nanopartículas de sílice de 12.167 mg L^{-1} , es decir, estas concentraciones en el ambiente tienen la capacidad de disminuir la población celular hasta un 50%.

La exposición a nanopartículas de grafeno y sílice y el análisis de la talla celular individual, mostraron que estas nanopartículas son capaces de disminuir el diámetro de la talla celular a partir de la concentración más baja del rango estudiado (0.74 mg L^{-1}) para cada nanomaterial. Dichos resultados plantean que la disminución de la talla celular en la especie de microalga *P. subcapitata* tiene el potencial de ser empleado como un indicador para evaluar los efectos adversos e identificar el grado de peligrosidad de los nanomateriales.

La prueba de exposición con la microalga *P. subcapitata* es una herramienta de utilidad que podría formar parte de una batería de pruebas para la evaluación de efectos asociados a nanomateriales, considerando como indicadores de utilidad tanto el efecto inhibitorio del crecimiento poblacional como en la reducción del tamaño celular, con el fin de discernir aquellos materiales inocuos al ambiente de otros que representen algún peligro a los ecosistemas. Cabe destacar que la inclusión de nuevos indicadores como la reducción y/o aumento en el diámetro de la talla celular en los protocolos de pruebas de toxicidad empleados actualmente son importantes para identificar de manera más detallada el riesgo ambiental que los nanomateriales representan, especialmente cuando su uso se está generalizando rápidamente y los estudios relacionados con sus efectos ambientales son escasos incluso en un plano internacional.

Con base a las evidencias derivadas de este estudio, se recomienda intensificar la investigación en materia de efectos toxicológicos e implicaciones ecológicas asociadas a la exposición a nanomateriales con el fin de estimar el nivel de riesgo y establecer lineamientos adecuados sobre la seguridad del almacenamiento, uso y disposición, mediante la generación de Normas Técnicas, Normas Oficiales Mexicanas o Reglamentos Oficiales, en donde se establezcan las bases para el control de las actividades vinculadas al uso de los nanomateriales, con el fin de resguardar los ecosistemas y la salud humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFNOR (1980). Norme experimental T90-304. Determination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Association Française de Normalisation. 5 de diciembre de 1980.
- Ahmad, J., Ahamed, M., Akhtar, M. J., Alrokayan, S. A., Siddiqui, M. A., Musarrat, J. y Al-Khedhairi, A. A. (2012). Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 259, 160-168.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K. y Kahru A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1461–1468.
- Aruoja V. (2011). Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of chemicals and synthetic nanoparticles. Tesis de Doctorado. Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian University of Life Sciences. Estonian. 100 pp.
- Beecher L. (2013). Assessment of 17 beta-estradiol removal from wastewater via abiotic and biotic routes and potential effects on food chain pathways. [En línea]. https://tigerprints.clemson.edu/all_dissertations/1083/24/12/2018.
- Biswas, P, Wu, C. Y. (2005). Nanoparticles and the environment. A critical review paper. *J. Air Waste Ma.* 55, 708-746.
- Blaise, C., Forget, G. y Trottier, S. (2000) Toxicity screening of aqueous samples using a costeffective 72-hour exposure *Selenastrum capricornutum* Assay, *Environmental Toxicology*. 15, 352-359.
- Boghossian A.A., Sen F. y Gibbons, B.M. (2013). Application of nanoparticle antioxidants to enable hyperstable chloroplasts for solar energy harvesting. *Adv Energy Mater.* 3, 881– 893.
- Castagnino M. (2006). Nanomateriales y contaminación ambiental. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 40, 1-2.
- Castillo E. (2015). Nanomateriales híbridos de óxido de grafeno y polímeros hidrosolubles para el diseño de plataformas biosensoras electroquímicas. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Madrid, 263 pp.

- Centro de Investigaciones en Óptica (2008). Agenda preliminar: taller nacional sobre desarrollo responsable, fabricación y uso de nanomateriales. [En línea] http://www.inecc.gob.mx/descargas/sqre/taller_nano_pre_agendav4.pdf 11/03/19
- Chang Y., Yang ST., Liu JH., Dong E., Wang Y., Cao A, Liu Y, Wang H (2011) In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett.* 200, 201–210.
- Clement I., Zenerino, A., Hurel, C., Amigoni, s., De Givenchy, E. T., Guittard, F. y Marmier, N. (2013). Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 450, 120-128.
- Combatt E., Palencia S., Palencia M. (2013). Toxicidad de nanopartículas inorgánicas sobre los microorganismos del suelo con importancia agrícola una revisión. *Temas agrarios.* 18. 106-122.
- Delgado, G. (2007) Incertidumbres de la nanotecnología: Riesgos ambientales y salud. *Ingeniería de Recursos Naturales y el Ambiente.* 6, 47-61.
- Delgado, G. (2009) Nanotecnología y producción de alimentos: impactos económicos, sociales y ambientales. *Estudios Sociales.* 17, 186-205.
- Díaz Del Castillo F. (2012). Introducción a los nanomateriales [en línea]. http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/Introduccion%20a%20los%20nanomateriales.pdf 10/09/2018.
- Díaz H., Ramírez A., Alejandro y Godínez D. (2019). Effect of microalgae size on the ingestion rate on larvae of *Artemia franciscana*. *Zootecnia Tropical.* 24,193-203.
- Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., y Ruoff, R. S. (2010). The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, 39, 228-240.
- Duan J., Yu Y., Shi H., Tian L. y Guo C. (2013) Toxic effects of silica nanoparticles on zebrafish embryos and larvae. *Plos one.* 8, 1-9.
- Fa Wenhong, Liu Yingying, Xu Zhizhen, Wang Xiangrui, Li Xiaomin y Luo Sheng-lian. (2016). The mechanism of chronic toxicity induced by graphene suspended in water column to *Daphnia magna*. *Environ. Sci: Nano.* 3, 2-36.
- Fenoglio, I., Greco, G., Livraghi, S. y Fubini, B. (2009). Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO₂ nanoparticles that may trigger toxic responses. *Chem. Eur. J.* 15,4614- 4621.
- Fernández A., Mendoza S., Morales F., De la Rosa-Fox, Santos, Piñero y Esquivias L. (2007). Aerogeles con aplicaciones en biomedicina y medioambiente. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.* 46, 138-144.

- Foladori G., Arteaga E., Zagayo E., Appelbaum R., Robles-Belmont E., Villa LL., Parker R. y Leos. (2017). La política pública de nanotecnología en México. *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad*. 34, 51-64.
- Foladori G., Bejarano F. y Ivernizzi N. (2013). Nanotecnología: gestión y reglamentación de riesgos para la salud y medio ambiente en América Latina y el Caribe [en línea]. <http://www.scielo.br/pdf/tes/v11n1/a09v11n1.pdf> 27/11/2018 .
- Franklin NM., Stauber JL. y Lim RP. (2001) Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ Toxicol Chem*. 20, 160–170.
- Frejo T., Díaz J., Lobo M., García J. y Capó M. (2011). Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina Balear*. 26 ,36-46.
- Fu H.P., R.Y. Hong, Y.J. Zhang, H.Z. Li, Y. Zheng, J. Ding, (2008). Reinforcement of PMMA with sol-gel-prepared silica, *Polym. Adv. Technol*. 19 1–8.
- Fujiwara K., Suematsu H., Kiyomira E., Aoki, M. y Moritoki, N.(2008). Size-dependent toxicity of silica nano particles to *chlorella kessleri*. *Journal of Environmental Science, Health A Toxic/Hazardous Substances Environmental Engineering*, 43, 1167-1173.
- Gambardella, C., Morgana, S., Di Bari, G., Ramoino, P., Bramini, M., Diaspro, A., Falugi, C. y Faimali, M. (2015). Multidisciplinary screening of toxicity induced by silica nanoparticles during sea urchin development. *Chemosphere*, 139, 486-495.
- Geim, A.K. y Novoselov, K.S. (2007) The rise of graphene. *Nature Materials*, 6, 183-191.
- Gerloff K, Albrecht C, Boots AW, Forster I, Schins RPF: Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. (2009). *Nanotoxicology*, 3, 355–364.
- Gollavelli G, Ling Y-C (2012) Multi-functional graphene as in vitro and in vivo imaging probe. *Biomater*. 33, 2532–2545.
- Hazeem, Layla., Bououdina., Mohamed., Dewailly., Etienne., Slomianny., Barras., Alexandre., Coffinier., Yannick., Szunerits., Sabine., Boukherroub y Rabah. (2016). Toxicity effect of graphene oxide on growth and photosynthetic pigment of the marine alga *Picochlorum* sp. during different growth stages. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 1-9.
- Hernandez T. (2017). Regulación en el uso de la nanotecnología aplicada a la salud en México: situación actual y perspectivas. UDLAP. [En línea]

<https://cegresados.udlap.mx/regulacion-en-el-uso-de-la-nanotecnologia-aplicada-a-la-salud-en-mexico-situacion-actual-y-perspectivas/> 11/03/2019.

- Hoet, P.H.M., Brüske-Hohlfeld, I. y Salata, O.V. (2004). Nanoparticles -known and unknown risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 1-15.
- Hu W., Peng C., Lv M., Li X., Zhang Y., Chen N., Fan C. y Huang Q. (2011) Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano*. 5, 3693–3700.
- Jaramillo N., Paucar C. y Garcia C. (2014). Nanopartículas de sílice: encapsulación de fármacos y tratamiento de enfermedades. *Revista Colombiana de Materiales*, 5, 74-83.
- Jastrzebsk M. y Olszyna A. (2015). The ecotoxicity of graphene family materials: current status, knowledge gaps and future needs. *Journal of nanoparticle research*. 17, 2-21.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K. y Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Crop Sci*. 5,709-725.
- Keller, A. y Lazareva, A. (2013). Predicted releases of engineered nanomaterials: From global to regional to local. *Environmental Science and Technology Letters*. Article ASAP.
- Keller, A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B. J., Miller, R. y Ji, Z. (2010). Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental Science and Technology*, 44, 6, 1962-1967.
- Lai HT., Hou JH., Su Cl. y Chen CL. (2009). Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72. 329-334.
- Limbach, L. K., Bereiter, R., Muller, E., Krebs, R., Galli, R. y Stark, W.J. (2008). Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: Influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency. *Environmental Science and Technology*. 42, 15, 5828-5833.
- LiQiang C, PingPing HU, Li Z, SiZhou H, LingFei L, ChengZhi H (2012). Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. *Sci China Chem*. 55, 2209–2216.
- Lira R. H., Mendez B. y Vera I. (2016). Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas elicidadas con nanopartículas [En línea]. <https://www.repositorionacionalcti.mx/recurso/oai:ciqa.repositorioinstitucional.mx:1025/335> 20/07/2019.
- Llinàs M. y Sánchez D. (2013). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad*. 71, 20-30.

- López V. (2009). Nanomateriales basados en carbono. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Inorgánica, Madrid, 336 pp.
- Ma, H., Williams, P. L. y Diamond, S. A. (2013). Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles-a review. *Environmental Pollution* 172, 76-85.
- Mao S., Pua H., y Chen J. (2012). Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress. *RSC Advances*, 2, 2643–2662.
- Marcano D.C., Kosynkin, D.V., Berlin, J.M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L.B., Lu, W. y Tour, J.M. (2010). Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano*, 4, 4806-4814.
- McLaren, A., Valdes, S.T., Li, G. y Tsang, S.C. (2009). Shape and size effects of ZnO nanocrystals on photocatalytic activity. *J. Am. Chem. Soc.* 131,12540-12541.
- Medina M., Galván R. y Reyes G. (2015). Las nanopartículas y el medio ambiente. *Universidad, Ciencia y Tecnología*. 19, 49-58.
- Mendoza G., Rodríguez-López y José Luis. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*. 29, 161-186 pp.
- Mesaric T, Sepcic K, Piazza V, Gambardella C, Garaventa F, Drobne D, Faimali M (2013) Effects of nano carbon black and single-layer graphene oxide on settlement, survival and swimming behaviour of *Amphibalanus Amphitrite* larvae. *Chem Ecol*. 29, 643–652.
- Nandanwar R., Singh P., and Haque F. (2013). Synthesis and properties of silica nanoparticles by sol-gel method for the application in green chemistry. *Material Science Research India*. 10. 75-83.
- Napierska D., Thomassen LCJ. y Lison D. The nanosilica hazard: another variable entity (2010). *Part Fibre Toxicol.* 7, 39.
- National Science Foundation (2004). International dialogue on responsible research and development of nanotechnology [en línea]. <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/src/intldialogue.htm> 26/11/2018 .
- National Science Foundation (2004). Questionnaire international dialogue on responsible r&d of nanotechnology [en línea]. www.nsf.gov/crssprgm/nano/activities/mcr_040616_usandrespnano_meridian_3.pdf 26/11/2018 .
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B, Filser J., Miao A.-J, Quigg A, Santschi P.H. y Sigg L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi, *Ecotoxicology*, 17, 372–386.

- NNI (2011). What is the nni? [en línea]. <http://nano.gov/about-nni/what> 13/10/2018.
- Nogueira, P.F.M., Nakabayashi, D., Zucolotto, V., (2015). The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata* Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology. 166,29-35.
- Olejnik, M., Krajnik, B., Kowalska, D., Twardowska, M., Czechowski, N., Hofmann, E. y Mackowski, S. (2013). Imaging of fluorescence enhancement in photosynthetic complexes coupled to silver nanowires. Applied Physics Letters. 102, 83703-83707.
- Perreault, F., Oukarroum, A. y Pirastru, L. (2010) Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence imaging in *Lemna gibba*. Journal of Botany. 22, 1-9.
- Pretti C, Oliva M, Di Pietro R, Monni G, Cevasco G, Chiellini F, Pomelli C, Chiappe C. (2014). Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. Ecotox Environ Safety. 101, 138–145.
- Ramírez P. & Mendoza A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. SEMARNAT. México D.F. 407 p.
- Red de Nanociencias y Nanotecnología (2008). Diagnóstico y prospectiva de la nanotecnología en México. [En línea]. <http://nanored.org.mx/documentos/Diagnostico%20y%20Prospectiva%20Nanotecnologia%20en%20Mexico.pdf> 11/03/19.
- Rico, C.M., Peralta-Videa, J.R. y Gardea-Torresdey, J.L. (2015). Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. In Nanotechnology and Plant Sciences (pp. 1-17). Springer International Publishing
- Romero J. (2017). Desarrollo de nanomateriales basados en silicio semiconductor. Tesis de Doctorado. Universidad nacional de la plata facultad de ciencias exactas departamento de química, La Plata, Argentina, 172 pp.
- Rosell M. G. y Senovilla L. (2008). Riesgos asociados a la nanotecnología [En línea]. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/786a820/797%20web.pdf> 24/12/2018.
- Schneider, J., Hock N., Weimer S., Borrmann S., Kirchner U., Vogt R. y Scheer, V. (2005). Nucleation particles in diesel exhaust: Composition inferred from in-situ mass spectrometric analysis, Environ. Sci. Technol. 39, 6153-6161.
- Schwab F., Bucheli T., Lukhele L., Magrez A., Nowack B., Sigg L., and Katja Knauer. (2011). Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? Environmental Science & Technology. 45 (14), 6136-6144.

- Secretaría de Economía (SE) (2008). Diagnóstico y prospectiva de la nanotecnología en México [en línea]. www.economia.gob.mx/pics/pages/944_base/Nanotecnologia.pdf 26/11/2018.
- Secretaría de Gobernación. Diario Oficial de la Federación. (2019). [En línea] http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5435776&fecha=03/05/2016 11/03/2019 .
- Si Y. (2008). Synthesis of water soluble graphene. Nano Letters, 8, 1679-1682.
- Slowing II., Wu CW., Vivero-Escoto JL., y Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells (2009). Small, 5, 57 – 62.
- USEPA (1993). EPA 600/4-90/027 Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, D.C., EUA, 273 pp.
- Van Hoecke K., A. C. De Schamphelaere., Van der Meeren P., Lucas S., y Janssen R. (2008). Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: importance of surface area. Environmental Toxicology and Chemistry. 27, 1948–1957.
- Wang G, Qian F, Saltikov CW, Jiao Y, Li Y (2011a) Microbial reduction of graphene oxide by *Shewanella*. Nano Res. 6, 563–570.
- Wang, Y., Kalinina, A., Sun, T. Y. y Nowack, B. (2016). Probabilistic modeling of the flows and environmental risks of nano-silica. Science of the Total Environment, 545, 67-76.
- Wei C., Zhang Y., Guo J., Han B., Yang X. y Junlin Yuan. (2010). Effects of silica nanoparticles on growth and photo synthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. 22, 155-160.
- Yamagishi T., Yamaguchi H., Suzuki S., Horie Y. y Tatarazako N. (2017). Cell reproductive patterns in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (= *Selenastrum capricornutum*) and their variations under exposure to the typical toxicants potassium dichromate and 3,5-DCP. PLOS ONE. 12(2), 1-12.
- Zanella R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. Mundo Nano, 6, 69-81.
- Záyago E. y Foladori G. (2010). La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. Economía, Sociedad y Territorio. 10, 143-178.
- Záyago E., Foladori G., Arteaga E., y P. Appelbaum. (2013). Empresas nanotecnológicas en México: hacia un primer inventario. Estudios sociales 42. 11-24.

- Záyago E., Foladori G., P. Appelbaum R. y Arteaga E. (2013). Empresas nanotecnológicas en México: hacia un primer inventario [en línea]. <http://www.scielo.org.mx/pdf/estsoc/v21n42/v21n42a1.pdf> 26/11/2018.
- Zhang L., Xia J., Zhao Q., Liu L. y Zhang Z. (2010) Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*. 6,537–544.

ANEXOS

Anexo A. Densidad algal, porcentaje de inhibición y cálculo de la Cl_{50-72h}

Tabla A1. Densidad algal de *Pseudokirchneriella subcapitata* expuestas grafeno, porcentaje de inhibición y cálculo de la Cl_{50-72h} .

NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO								
Concentración de pruebas mg L ⁻¹	Eventos						$\bar{x}$ Densidad algal	$\bar{x}$ Inhibición (%)
	1		2		3			
	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)		
Control	190.67	0.00	285.27	0.00	280.27	0.00	252.07	0.00
0.75	198.13	3.91	208.75	26.82	233.57	16.66	213.48	15.80
1.55	178.13	6.58	186.89	34.49	223.75	20.17	196.25	20.41
3.13	171.38	10.12	233.29	18.22	206.88	26.19	203.85	18.17
6.25	162.63	14.71	226.22	20.70	198.44	29.19	195.76	21.53
12.50	42.63	77.64	85.75	69.94	83.33	70.27	70.57	72.62
25	42.50	77.71	74.00	74.06	108.71	61.21	75.07	70.99
50	41.00	78.50	39.63	86.11	57	79.66	45.88	81.42
Cl ₅₀		10.745		11.482		9.631		10.619
D.S.				0.93				
Cv				9%				

$\bar{x}$ = Valor Promedio D.S = Desviación Estándar, Cv = Coeficiente de variación

Tabla A2. Densidad algal de *Pseudokirchneriella subcapitata* expuestas nanopartículas de sílice, porcentaje de inhibición y cálculo de la CI_{50-72h} .

NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE								
Concentración de pruebas mg L ⁻¹	Eventos						$\bar{x}$ Densidad algal	$\bar{x}$ Inhibición (%)
	1		2		3			
	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)		
Control	195.14	0.00	198.57	0.00	192.07	0.00	195.26	0.00
0.75	169.14	13.32	173.22	12.77	163.75	14.74	168.71	13.61
1.55	164.63	15.64	153.29	22.81	143.33	25.37	153.75	21.27
3.13	158.56	18.75	143.13	27.92	133.50	30.49	145.06	25.72
6.25	110.63	43.31	124.25	37.43	121.22	36.89	118.70	39.21
12.50	102.00	47.73	117.25	40.95	104.50	45.59	107.92	44.76
25	57.50	70.53	58.33	70.62	60.67	68.41	58.83	69.86
50	62.44	68.00	59.00	70.29	55.75	70.97	59.06	69.75
Cl ₅₀	12.588		12.406		11.508		12.167	
D.S.	0.578							
Cv	5%							

$\bar{x}$ = Valor Promedio D.S = Desviación Estándar, Cv = Coeficiente de variación

Tabla A3. Densidad algal de *Pseudokirchneriella subcapitata* expuestas al control positivo Cu⁺², porcentaje de inhibición y cálculo de la Cl_{50-72h}.

Cu ⁺²								
Eventos								
Concentración mg L ⁻¹	1		2		3		$\bar{x}$	$\bar{x}$
	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)
Control	190.67	0.00	280.27	0.00	196.00	0.00	222.31	0.00
0.02	142.00	25.52	194.33	30.66	128.89	34.24	155.07	30.14
0.03	108.22	43.24	78.22	72.09	97.22	50.40	94.56	55.24
0.04	55.78	70.75	43.67	84.42	60.78	68.99	53.41	74.72
0.05	6.67	96.50	7.00	97.50	8.56	95.63	7.41	96.55
Cl ₅₀	0.026		0.024		0.027		0.026	
D.S.	0.002							
Cv	6%							

$\bar{x}$ = Valor Promedio D.S = Desviación Estándar, Cv = Coeficiente de variación

Anexo B. Resultados de la talla (diámetro μm) celular algal invidual.

Tabla B1. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de grafeno.

Diámetro celular algal individual (µm)	EVENTO 1: GRAFENO							
	Control	Concentración de pruebas (mg L ⁻¹)						
		0.75	1.55	3.13	6.25	12.5	25	50
	7.143	8.571	5.714	7.143	8.571	7.143	8.571	7.143
	8.571	8.571	8.571	8.571	8.571	7.143	7.143	5.714
	8.571	8.571	8.571	10.000	7.143	7.143	7.143	10.000
	10.000	8.571	5.714	5.714	7.143	8.571	5.714	7.143
	12.857	8.571	8.571	7.143	7.143	5.714	5.714	8.571
	10.000	11.429	7.143	7.143	5.714	7.143	5.714	10.000
	10.000	7.143	7.143	5.714	10.000	7.143	8.571	7.143
	11.429	8.571	5.714	7.143	10.000	8.571	8.571	8.571
	10.000	7.143	5.714	8.571	7.143	5.714	8.571	5.714
	8.571	8.571	8.571	8.571	7.143	5.714	7.143	5.714
	11.429	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	8.571	8.571
	10.000	8.571	7.143	8.571	8.571	8.571	10.000	7.143
	11.429	7.143	5.714	10.000	8.571	7.143	8.571	5.714
	11.429	7.143	5.714	5.714	10.000	7.143	8.571	5.714
	10.000	7.143	7.143	8.571	8.571	7.143	8.571	8.571
	11.429	7.143	7.143	7.143	8.571	10.000	5.714	7.143
	11.429	7.143	7.143	5.714	8.571	7.143	7.143	7.143
	10.000	8.571	5.714	5.714	7.143	8.571	5.714	5.714
	8.571	8.571	5.714	5.714	10.000	8.571	8.571	8.571
	11.429	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	8.571	10.000
	11.429	5.714	8.571	5.714	8.571	7.143	7.143	8.571
	11.429	7.143	7.143	7.143	11.429	5.714	7.143	5.714
	12.857	10.000	10.000	4.286	8.571	5.714	5.714	8.571
	14.286	10.000	7.143	8.571	10.000	8.571	7.143	7.143
	11.429	7.143	7.143	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143
	12.857	5.714	5.714	5.714	11.429	10.000	7.143	8.571
	10.000	7.143	7.143	5.714	5.714	7.143	7.143	8.571
	11.429	10.000	7.143	10.000	7.143	8.571	8.571	8.571
	8.571	7.143	8.571	5.714	7.143	8.571	8.571	7.143
	10.000	7.143	10.000	7.143	5.714	10.000	5.714	7.143

Tabla B1. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de grafeno (Continuación).

Diámetro celular algal individual (μm)	EVENTO 2: GRAFENO							
	Control	Concentración de pruebas (mg L^{-1})						
		0.75	1.55	3.13	6.25	12.5	25	50
10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	5.714	10.000	7.143
11.429	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	4.286	8.571
10.000	5.714	8.571	8.571	8.571	5.714	7.143	7.143	8.571
10.000	8.571	10.000	10.000	8.571	7.143	7.143	7.143	7.143
8.571	8.571	8.571	5.714	7.143	4.286	5.714	5.714	5.714
8.571	7.143	7.143	7.143	5.714	7.143	8.571	7.143	7.143
10.000	10.000	7.143	7.143	5.714	7.143	5.714	8.571	8.571
7.143	8.571	7.143	7.143	7.143	11.429	7.143	5.714	5.714
10.000	7.143	7.143	7.143	10.000	7.143	7.143	5.714	5.714
7.143	7.143	10.000	10.000	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143
11.429	10.000	7.143	10.000	8.571	7.143	5.714	7.143	7.143
8.571	8.571	7.143	10.000	5.714	7.143	5.714	7.143	7.143
10.000	7.143	7.143	5.714	7.143	7.143	8.571	7.143	7.143
8.571	7.143	11.429	7.143	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143
11.429	10.000	8.571	7.143	7.143	8.571	8.571	8.571	8.571
7.143	7.143	8.571	8.571	8.571	7.143	7.143	5.714	5.714
8.571	10.000	7.143	8.571	7.143	5.714	10.000	10.000	10.000
11.429	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143
10.000	10.000	10.000	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143
11.429	7.143	5.714	7.143	5.714	5.714	5.714	7.143	7.143
10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	8.571	5.714	5.714
8.571	5.714	5.714	5.714	5.714	5.714	8.571	5.714	5.714
10.000	10.000	5.714	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143	7.143
10.000	8.571	7.143	7.143	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143
8.571	10.000	7.143	10.000	7.143	8.571	8.571	5.714	5.714
10.000	7.143	7.143	8.571	8.571	7.143	7.143	7.143	7.143
11.429	5.714	5.714	7.143	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143
10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	5.714	7.143	7.143
11.429	10.000	11.429	7.143	7.143	8.571	7.143	5.714	5.714
11.429	10.000	7.143	8.571	8.571	7.143	7.143	8.571	8.571

Tabla B1. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de grafeno (Continuación).

Diámetro celular algal individual (μm)	EVENTO 3: GRAFENO							
	Control	Concentración de pruebas (mg L^{-1})						
		0.75	1.55	3.13	6.25	12.5	25	50
8.571	7.143	7.143	10.000	7.143	7.143	7.143	5.714	7.143
10.000	10.000	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143	8.571	7.143
8.571	7.143	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	5.714	7.143
11.429	10.000	7.143	8.571	5.714	5.714	7.143	7.143	5.714
7.143	8.571	10.000	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143	8.571
8.571	7.143	5.714	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143
10.000	7.143	7.143	10.000	7.143	5.714	5.714	5.714	8.571
7.143	7.143	5.714	5.714	7.143	7.143	7.143	5.714	7.143
10.000	7.143	5.714	7.143	5.714	7.143	7.143	8.571	7.143
7.143	5.714	7.143	7.143	8.571	4.286	7.143	7.143	7.143
11.429	10.000	7.143	8.571	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143
8.571	8.571	7.143	8.571	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143
10.000	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	8.571	8.571
8.571	7.143	7.143	10.000	7.143	5.714	7.143	7.143	5.714
11.429	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	8.571	5.714
7.143	7.143	7.143	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143	8.571
10.000	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	5.714
7.143	7.143	7.143	8.571	7.143	7.143	10.000	8.571	8.571
10.000	10.000	10.000	5.714	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143
7.143	7.143	5.714	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143
11.429	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	5.714
10.000	7.143	5.714	7.143	5.714	5.714	5.714	5.714	8.571
11.429	5.714	5.714	8.571	7.143	7.143	8.571	8.571	7.143
10.000	7.143	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143
10.000	10.000	7.143	7.143	7.143	5.714	8.571	8.571	8.571
8.571	10.000	7.143	7.143	5.714	7.143	7.143	7.143	5.714
8.571	5.714	7.143	7.143	8.571	5.714	8.571	8.571	5.714
10.000	7.143	10.000	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143	7.143
7.143	10.000	7.143	10.000	5.714	5.714	8.571	7.143	7.143
10.000	7.143	7.143	10.000	7.143	5.714	8.571	8.571	7.143

Tabla B1. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de grafeno (Continuación).

$\bar{x}$	9.873	8.079	7.381	7.556	7.476	7.111	7.397	7.270
D.S.	1.568	1.455	1.359	1.440	1.304	1.192	1.203	1.166
Cv	15.887	18.009	18.407	19.065	17.436	16.761	16.269	16.039

Análisis estadístico para la diferencia de media (Prueba t-student, $p = 0.05$)

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con partículas de grafeno.

Comparación de medias (talla celular individual)	Control	0.75 mg L⁻¹
Media	9.873	8.079
Varianza	2.460	2.117
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	8.540	
P(T<=t) una cola	1.68E-13	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	3.35E-13	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

Comparación de medias (talla celular individual)	Control	1.55 mg L⁻¹
Media	9.873	7.381
Varianza	2.460	1.846
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	11.009	
P(T<=t) una cola	1.36E-18	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	2.71E-18	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con partículas de grafeno. (Continuación)

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>3.13 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	7.556
Varianza	2.460	2.075
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	9.852	
P(T<=t) una cola	3.23E-16	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	6.46E-16	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>6.25 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	7.476
Varianza	2.460	1.699
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	13.187	
P(T<=t) una cola	6.01E-23	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	1.20E-22	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>12.50 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	7.111
Varianza	2.460	1.421
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	14.147	
P(T<=t) una cola	8.55E-25	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	1.71E-24	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con partículas de grafeno. (Continuación)

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>25 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	7.397
Varianza	2.460	1.448
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	11.39	
P(T<=t) una cola	2.31E-19	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	4.61E-19	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>50 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	7.270
Varianza	2.460	1.360
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	13.444	
P(T<=t) una cola	1.91E-23	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	3.81E-23	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

Tabla B2. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de sílice.

Diámetro celular algal individual (μm)	EVENTO 1: NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE							
	Control	Concentración de pruebas (mg L^{-1})						
		0.75	1.55	3.13	6.25	12.5	25	50
8.571	8.571	8.571	7.143	8.571	5.714	8.571	8.571	7.143
8.571	8.571	8.571	8.571	10.000	8.571	8.571	8.571	8.571
10.000	8.571	10.000	10.000	10.000	7.143	7.143	5.714	5.714
11.429	7.143	8.571	8.571	7.143	7.143	10.000	7.143	7.143
10.000	5.714	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143	8.571	8.571
8.571	4.286	7.143	10.000	7.143	8.571	8.571	8.571	5.714
8.571	5.714	8.571	11.429	10.000	10.000	7.143	4.286	
10.000	7.143	8.571	10.000	7.143	7.143	7.143	10.000	
10.000	7.143	10.000	11.429	8.571	7.143	7.143	7.143	
8.571	5.714	8.571	8.571	10.000	7.143	8.571	10.000	
11.429	7.143	8.571	5.714	7.143	8.571	11.429	8.571	
10.000	7.143	7.143	8.571	5.714	7.143	8.571	8.571	
11.429	8.571	5.714	8.571	5.714	8.571	7.143	8.571	
8.571	7.143	8.571	7.143	5.714	8.571	8.571	7.143	
10.000	7.143	7.143	7.143	5.714	10.000	8.571	5.714	
10.000	5.714	5.714	7.143	10.000	7.143	10.000	7.143	
10.000	7.143	7.143	7.143	8.571	8.571	7.143	5.714	
11.429	8.571	7.143	8.571	8.571	7.143	8.571	8.571	
11.429	7.143	8.571	10.000	7.143	5.714	8.571	7.143	
11.429	11.429	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143	10.000	
10.000	7.143	8.571	8.571	8.571	8.571	7.143	7.143	
10.000	7.143	8.571	7.143	10.000	10.000	8.571	7.143	
11.429	7.143	10.000	8.571	11.429	8.571	7.143	7.143	
10.000	8.571	7.143	7.143	10.000	7.143	8.571	7.143	
8.571	10.000	7.143	8.571	8.571	7.143	8.571	7.143	
12.857	5.714	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143	7.143	
11.429	5.714	7.143	10.000	8.571	5.714	10.000	7.143	
10.000	7.143	5.714	8.571	10.000	7.143	8.571	5.714	
7.143	8.571	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143	8.571	
8.571	8.571	7.143	5.714	7.143	8.571	8.571	8.571	

Tabla B2. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de sílice
(Continuación).

Diámetro celular algal individual (μm)	EVENTO 2: NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE							
	Control	Concentración de pruebas (mg L^{-1})						
		0.75	1.55	3.13	6.25	12.5	25	50
10.000	7.143	8.571	7.143	8.571	5.714	10.000	8.571	
10.000	8.571	8.571	7.143	8.571	8.571	8.571	7.143	
11.429	5.714	8.571	7.143	8.571	8.571	5.714	5.714	
7.143	5.714	7.143	8.571	10.000	8.571	8.571	8.571	
10.000	5.714	5.714	8.571	8.571	7.143	10.000	7.143	
11.429	10.000	8.571	10.000	5.714	7.143	10.000	7.143	
10.000	8.571	5.714	8.571	7.143	7.143	7.143	5.714	
8.571	8.571	5.714	5.714	7.143	7.143	8.571	7.143	
8.571	8.571	7.143	7.143	7.143	7.143	8.571	7.143	
10.000	8.571	7.143	7.143	7.143	8.571	7.143	5.714	
11.429	10.000	7.143	8.571	10.000	7.143	5.714	10.000	
10.000	7.143	5.714	7.143	7.143	8.571	7.143	10.000	
8.571	10.000	8.571	10.000	5.714	7.143	10.000	5.714	
10.000	11.429	8.571	8.571	8.571	7.143	8.571	5.714	
11.429	8.571	8.571	8.571	7.143	8.571	8.571	7.143	
11.429	8.571	8.571	8.571	5.714	8.571	5.714	7.143	
10.000	10.000	7.143	7.143	8.571	10.000	5.714	10.000	
10.000	5.714	8.571	5.714	10.000	10.000	7.143	8.571	
10.000	7.143	10.000	7.143	7.143	8.571	7.143	7.143	
10.000	8.571	8.571	5.714	5.714	5.714	7.143	7.143	
10.000	8.571	5.714	8.571	8.571	7.143	5.714	5.714	
11.429	7.143	8.571	8.571	5.714	5.714	7.143	5.714	
10.000	7.143	7.143	7.143	8.571	7.143	7.143	5.714	
11.429	8.571	10.000	8.571	8.571	10.000	7.143	5.714	
10.000	10.000	7.143	8.571	7.143	8.571	8.571	7.143	
11.429	8.571	5.714	11.429	7.143	8.571	8.571	7.143	
10.000	8.571	7.143	7.143	5.714	7.143	5.714	5.714	
10.000	8.571	7.143	10.000	7.143	7.143	7.143	5.714	
11.429	10.000	7.143	10.000	8.571	7.143	8.571	8.571	
10.000	7.143	7.143	8.571	8.571	8.571	7.143	10.000	

Tabla B2. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de sílice
(Continuación).

Diámetro celular algal individual (μm)	EVENTO 3: NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE							
	Control	Concentración de pruebas (mg L^{-1})						
		0.75	1.55	3.13	6.25	12.5	25	50
10.000	8.571	8.571	7.143	7.143	5.714	5.714	5.714	5.714
11.429	5.714	5.714	7.143	7.143	8.571	8.571	8.571	8.571
10.000	5.714	5.714	8.571	7.143	8.571	10.000	7.143	7.143
11.429	5.714	7.143	7.143	7.143	8.571	10.000	7.143	7.143
10.000	10.000	7.143	10.000	10.000	7.143	7.143	7.143	7.143
11.429	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143	8.571	5.714	5.714
10.000	8.571	5.714	8.571	5.714	7.143	8.571	5.714	5.714
10.000	7.143	8.571	8.571	8.571	10.000	7.143	8.571	8.571
11.429	8.571	8.571	7.143	7.143	8.571	7.143	10.000	10.000
10.000	5.714	8.571	5.714	5.714	8.571	10.000	8.571	8.571
8.571	5.714	8.571	7.143	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143
10.000	5.714	8.571	7.143	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143
11.429	10.000	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143	5.714	5.714
11.429	8.571	8.571	8.571	10.000	8.571	7.143	5.714	5.714
10.000	8.571	7.143	8.571	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143
11.429	8.571	5.714	10.000	8.571	7.143	8.571	10.000	10.000
10.000	8.571	8.571	11.429	10.000	8.571	8.571	8.571	8.571
8.571	10.000	5.714	7.143	7.143	7.143	5.714	7.143	7.143
8.571	5.714	5.714	10.000	5.714	8.571	7.143	7.143	7.143
10.000	7.143	8.571	10.000	8.571	7.143	10.000	5.714	5.714
11.429	8.571	7.143	8.571	5.714	7.143	7.143	7.143	7.143
10.000	8.571	10.000	5.714	8.571	8.571	8.571	7.143	7.143
10.000	7.143	7.143	8.571	8.571	8.571	8.571	5.714	5.714
10.000	7.143	5.714	8.571	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143
10.000	8.571	7.143	7.143	7.143	8.571	5.714	7.143	7.143
10.000	10.000	7.143	8.571	7.143	7.143	7.143	5.714	5.714
11.429	8.571	10.000	8.571	7.143	7.143	10.000	10.000	10.000
10.000	7.143	7.143	11.429	10.000	7.143	8.571	7.143	7.143
11.429	10.000	5.714	7.143	7.143	8.571	8.571	5.714	5.714
10.000	11.429	7.143	10.000	5.714	7.143	5.714	8.571	8.571

Tabla B2. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con partículas de sílice (Continuación).

$\bar{x}$	10.175	7.889	7.603	8.286	7.778	7.841	7.921	7.302
D.S.	1.088	1.548	1.264	1.424	1.422	1.076	1.288	1.395
Cv	10.697	19.618	16.622	17.183	18.287	13.722	16.259	19.108

Análisis estadístico para la diferencia de media (Prueba t-student, $p = 0.05$)

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con partículas de sílice.

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>0.75 mg L⁻¹</i>
Media	10.175	7.889
Varianza	1.184	2.395
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	12.120	
P(T<=t) una cola	7.72E-21	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	1.54E-20	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>1.55 mg L⁻¹</i>
Media	10.175	7.603
Varianza	1.184	1.597
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	14.805	
P(T<=t) una cola	4.92E-26	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	9.85E-26	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con partículas de sílice. (Continuación)

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>3.13 mg L⁻¹</i>
Media	10.175	8.286
Varianza	1.184	2.027
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	10.236	
P(T<=t) una cola	5.22E-17	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	1.04E-16	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>3.13 mg L⁻¹</i>
Media	10.175	8.286
Varianza	1.184	2.027
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	10.236	
P(T<=t) una cola	5.22E-17	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	1.04E-16	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>12.50 mg L⁻¹</i>
Media	10.175	7.841
Varianza	1.184	1.158
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	14.138	
P(T<=t) una cola	8.87E-25	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	1.77E-24	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con partículas de sílice. (Continuación)

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>25 mg L⁻¹</i>
Media	10.175	7.921
Varianza	1.184	1.658
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	12.483	
P(T<=t) una cola	1.46E-21	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	2.91E-21	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>50 mg L⁻¹</i>
Media	10.175	7.302
Varianza	1.184	1.947
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	15.727	
P(T<=t) una cola	9.93E-28	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	1.99E-27	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	SIGNIFICATIVA	

Tabla B3. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con Cu^{+2} .

Diámetro celular algal individual (μm)	COBRE				
	Control	Concentración de pruebas ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		0.02	0.03	0.04	0.05
	7.143	8.571	10.000	11.429	11.429
	8.571	10.000	10.000	11.429	8.571
	8.571	11.429	8.571	10.000	10.000
	10.000	11.429	8.571	11.429	11.429
	12.857	11.429	11.429	8.571	10.000
	10.000	8.571	11.429	8.571	10.000
	10.000	8.571	11.429	12.857	11.429
	11.429	10.000	8.571	10.000	11.429
	10.000	12.857	10.000	8.571	11.429
	8.571	11.429	11.429	7.143	10.000
	11.429	8.571	12.857	10.000	8.571
	10.000	7.143	12.857	11.429	10.000
	11.429	10.000	11.429	12.857	11.429
	11.429	10.000	11.429	10.000	12.857
	10.000	12.857	11.429	10.000	10.000
	11.429	11.429	11.429	8.571	11.429
	11.429	11.429	10.000	11.429	11.429
	10.000	10.000	10.000	11.429	11.429
	8.571	8.571	8.571	12.857	10.000
	11.429	10.000	11.429	10.000	10.000
	11.429	11.429	12.857	11.429	10.000
	11.429	12.857	11.429	11.429	7.143
	12.857	11.429	10.000	8.571	8.571
	14.286	11.429	11.429	8.571	12.857
	11.429	11.429	10.000	11.429	11.429
	12.857	11.429	8.571	10.000	10.000
	10.000	10.000	14.286	11.429	11.429
	11.429	12.857	12.857	11.429	10.000
	8.571	10.000	11.429	10.000	8.571
	10.000	10.000	11.429	10.000	8.571

Tabla B3. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con Cu^{+2}
(Continuación).

Diámetro celular algal individual (μm)	COBRE				
	Control	Concentración de pruebas ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		0.02	0.03	0.04	0.05
	10.000	8.571	11.429	10.000	11.429
	11.429	10.000	10.000	8.571	8.571
	10.000	10.000	8.571	14.286	10.000
	10.000	8.571	11.429	8.571	10.000
	8.571	7.143	11.429	10.000	8.571
	8.571	8.571	8.571	11.429	7.143
	10.000	10.000	10.000	11.429	10.000
	7.143	10.000	10.000	8.571	14.286
	10.000	10.000	11.429	14.286	14.286
	7.143	11.429	11.429	11.429	11.429
	11.429	8.571	8.571	11.429	10.000
	8.571	10.000	7.143	11.429	11.429
	10.000	8.571	7.143	11.429	8.571
	8.571	10.000	8.571	7.143	5.714
	11.429	10.000	10.000	8.571	10.000
	7.143	8.571	10.000	11.429	8.571
	8.571	7.143	8.571	11.429	10.000
	11.429	8.571	11.429	10.000	10.000
	10.000	10.000	8.571	12.857	10.000
	11.429	8.571	10.000	8.571	11.429
	10.000	10.000	10.000	10.000	11.429
	8.571	8.571	8.571	8.571	8.571
	10.000	15.714	10.000	10.000	10.000
	10.000	8.571	10.000	7.143	7.143
	8.571	10.000	10.000	10.000	11.429
	10.000	10.000	8.571	10.000	10.000
	11.429	11.429	11.429	11.429	11.429
	10.000	10.000	10.000	10.000	11.429
	11.429	10.000	8.571	8.571	8.571
	11.429	10.000	10.000	7.143	10.000

Tabla B3. Talla (diámetro μm) de *Pseudokirchneriella subcapitata* con Cu^{+2}
(Continuación).

Diámetro celular algal individual (μm)	COBRE				
	Control	Concentración de pruebas ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		0.02	0.03	0.04	0.05
8.571	8.571	8.571	11.429	11.429	7.143
10.000	14.286	10.000	8.571	8.571	8.571
8.571	8.571	8.571	7.143	14.286	14.286
11.429	10.000	10.000	7.143	14.286	14.286
7.143	8.571	10.000	8.571	11.429	11.429
8.571	10.000	8.571	10.000	10.000	10.000
10.000	10.000	7.143	10.000	10.000	10.000
7.143	8.571	10.000	8.571	11.429	11.429
10.000	7.143	14.286	11.429	11.429	11.429
7.143	8.571	14.286	8.571	8.571	8.571
11.429	10.000	11.429	11.429	10.000	10.000
8.571	10.000	10.000	11.429	11.429	11.429
10.000	8.571	11.429	11.429	8.571	8.571
8.571	10.000	8.571	7.143	5.714	5.714
11.429	10.000	10.000	8.571	10.000	10.000
7.143	8.571	10.000	11.429	8.571	8.571
10.000	7.143	8.571	11.429	10.000	10.000
7.143	8.571	11.429	10.000	10.000	10.000
10.000	10.000	8.571	10.000	10.000	10.000
7.143	8.571	10.000	11.429	11.429	11.429
11.429	10.000	10.000	11.429	11.429	11.429
10.000	8.571	8.571	8.571	8.571	8.571
11.429	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
10.000	8.571	10.000	7.143	7.143	7.143
10.000	10.000	10.000	11.429	11.429	11.429
8.571	10.000	8.571	10.000	14.286	14.286
8.571	8.571	11.429	11.429	11.429	11.429
10.000	10.000	10.000	11.429	10.000	10.000
7.143	8.571	8.571	8.571	11.429	11.429
10.000	10.000	10.000	7.143	8.571	8.571
$\bar{x}$	9.873	9.841	10.222	10.127	10.222
D.S.	1.568	1.521	1.513	1.668	1.752
Cv	15.887	15.455	14.800	16.468	17.137

Análisis estadístico para la diferencia de media (Prueba t-student, $p = 0.05$)

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con Cu^{+2} .

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>0.02 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	9.841
Varianza	2.460	2.313
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	0.172	
P(T<=t) una cola	0.432	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	0.8640	
Valor crítico de t (dos colas)	1.9870	
Diferencia real de medias	NO SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>0.03 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	10.222
Varianza	2.460	2.289
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89.000	
Estadístico t	-1.637	
P(T<=t) una cola	0.053	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	0.105	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	NO SIGNIFICATIVA	

Talla (diámetro μm) de *P. subcapitata* con Cu^{+2} . (Continuación)

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>0.04 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	10.127
Varianza	2.460	2.781
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	-1.029	
P(T<=t) una cola	0.153	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	0.306	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	NO SIGNIFICATIVA	

<i>Comparación de medias (talla celular individual)</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 mg L⁻¹</i>
Media	9.873	10.222
Varianza	2.460	3.069
Observaciones	90	90
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	89	
Estadístico t	-1.441	
P(T<=t) una cola	0.077	
Valor crítico de t (una cola)	1.662	
P(T<=t) dos colas	0.153	
Valor crítico de t (dos colas)	1.987	
Diferencia real de medias	NO SIGNIFICATIVA	