



Trabajo Fin de Grado

Estudio de la liberación de plata desde recipientes
de plástico de uso alimentario con nanopartículas
de plata mediante el uso de algas como
biosensores

Autor

David Ojeda Asensio

Director/es

Enrique Navarro Rodríguez

Yolanda Echegoyen Sanz

Ponente

Esther Asensio Casas

Grado en Ciencias Ambientales / Escuela Politécnica Superior de Huesca

Septiembre de 2014

RESUMEN

Las nanopartículas de plata son uno de los productos más utilizados en la nanotecnología, sector que está en pleno auge. En este trabajo se ha estudiado la liberación de este tipo de material desde los recipientes para conservar alimentos “Kinetic Go Green”. La plata liberada desde estos envases en un medio líquido se ha valorado mediante técnicas analíticas (ICP-MS) y mediante el uso de biosensores (alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*). Se ha estudiado cómo los cambios en factores como el pH del medio, la temperatura y el tiempo de exposición afectan a la liberación de plata desde los recipientes de plástico. Los resultados demuestran que existe liberación de plata. Las concentraciones liberadas son lo suficientemente elevadas como para ser detectadas mediante ICP-MS y también como para provocar un efecto tóxico sobre la fotosíntesis del organismo utilizado como biosensor. Ni un menor pH ni una mayor temperatura parecen incrementar la cantidad de plata liberada. Los resultados de toxicidad sobre la fotosíntesis algal, sugieren que la liberación de plata desde los recipientes puede ser tanto en forma de plata iónica Ag^+ (libre o ligada a otros compuestos plásticos) como en forma de plata metálica (nanoparticulada seguramente). La liberación de Ag^+ se debe a la oxidación de las nanopartículas, y este proceso sí que parece favorecido por el calentamiento en microondas de las muestras.

Palabras clave: nanopartícula, plata, ecotoxicología, *Chlamydomonas reinhardtii*, ICP-MS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE FOTOGRAFÍAS.....	2
ÍNDICE TABLAS	2
ÍNDICE FIGURAS	3
ÍNDICE GRÁFICAS.....	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Utilización de nanopartículas en la actualidad.....	4
1.2 Nanopartículas de plata	5
1.3 Comportamiento AgNP en ambientes acuáticos	6
1.4 Interacción AgNP con organismos	7
1.5 Ecotoxicidad de AgNP.....	8
1.6 Aproximación experimental propuesta	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10

3.1. Ensayos ecotoxicológicos	10
3.1.1. Cultivos algales	10
3.1.2. Calibración de la respuesta fotosintética a la plata	12
3.1.3. Muestras de AgNP procedentes de envases de uso alimentario.....	12
3.1.4. Ensayos: técnica fluorométrica	13
3.1.5. Curva dosis-respuesta	17
3.2. Análisis mediante ICP-MS.....	18
3.2.1. Preparación muestras	18
3.2.2. Medida en ICP-MS.....	19
3.2.3. Determinación de concentraciones de las muestras	19
3.3. Tratamiento estadístico	20
4. RESULTADOS PRE-EXPERIMENTACIÓN	20
5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	23
5.1 Curva dosis-respuesta	23
5.2 Resultados de soluciones con AgNP.....	25
5.2.1 Cantidad de plata liberada por superficie	25
5.2.2 Ensayos ecotoxicidad con AgNP.....	30
6. DISCUSIÓN.....	34
7. CONCLUSIONES	36
8. BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Etapas de cultivo de algas para experimentación.....	10
Fotografía 2. Envase de plástico Kinetic Go Green.....	12
Fotografía 3. MINI-PAM II (derecha) junto con muestras de plata con algas, dispuestas para ensayo	13
Fotografía 4. Equipo ICP-MS, localizado en el CPS (Zaragoza)	19

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de Yield normalizado, expresados en función del pH correspondiente y su tiempo de exposición con algas	21
Tabla 2. Valores de EC ₅₀ para cada curva dosis-respuesta en función del pH y el tiempo de exposición ..	23
Tabla 3. Datos EC ₅₀ para diferentes tiempos de exposición con su correspondiente error estándar.....	24
Tabla 4. Comparación datos EC ₅₀ entre diferentes tiempos de exposición	24
Tabla 5. Resultados de cantidades de plata liberada por superficie de plástico en los experimentos realizados, medidos mediante ICP-MS	25
Tabla 6. Resumen datos de plata liberada (AgNP) en función del pH	26
Tabla 7. Condiciones para la determinación de <i>outliers</i> para datos a pH 5.5	26

Tabla 8. Resumen parámetros test ANOVA para muestras en función del pH	27
Tabla 9. Conjunto de datos experimentales clasificados en uso con microondas	28
Tabla 10. Condiciones para la determinación de <i>outliers</i> para datos con/sin microondas.....	28
Tabla 11. Resumen parámetros test ANOVA para muestras en función del pH	29
Tabla 12. Resultados de ensayos ecotoxicológicos para estimación de cantidades de plata liberadas en función de tiempos de exposición con algas	30
Tabla 13. Determinación del límite de sensibilidad para los ensayos de ecotoxicidad con algas como biosensores.....	31
Tabla 14. Tabla resumen con los datos experimentales de los ensayos ecotoxicológicos a 1, 2 y 3 horas utilizados en la comparativa estadística.....	33
Tabla 15. Resumen test ANOVA para muestras en función del tiempo de exposición (datos brutos)	33
Tabla 16. Resumen test ANOVA para muestras en función del tiempo de exposición sin microondas.....	33
Tabla 17. Resumen test ANOVA para muestras en función del tiempo de exposición con microondas	34
Tabla 18. Resumen test ANOVA para muestras en función del calentamiento con microondas a 1h.....	34
Tabla 19. Resumen test ANOVA para muestras en función del calentamiento con microondas a 2h.....	34
Tabla 20. Resumen test ANOVA para muestras en función del calentamiento con microondas a 3h.....	34

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de dosis-respuesta, obtenida con programa R	17
Figura 2. Curvas dosis-respuesta pertenecientes al pre-experimento 1, con AgNO_3 , a 1 y 2 horas	21
Figura 3. Curvas dosis-respuesta a distintos pH representadas a 1h y 2h	23
Figura 4. Curva dosis-respuesta con todos los datos experimentales con AgNO_3	24

ÍNDICE GRÁFICAS

Gráfica 1. Representación de rendimientos de la fotosíntesis para diversos pH para varios tiempos	22
Gráfica 2. Resultados de cantidades de plata liberadas por superficie en función del pH	26
Gráfica 3. Representación de los promedios de plata liberada por cada pH	27
Gráfica 4. Liberación de plata por unidad de superficie en experimento 1 a distintos pH	27
Gráfica 5. Datos de cantidades de plata liberadas en función de si la muestras eran calentadas con microondas.....	29
Gráfica 6. Representación de los promedios de plata liberada en función del uso de microondas con sus desviaciones estándar	29
Gráfica 7. Comparativa cantidades de plata liberada en función de procedimiento de calentamiento, en varios experimentos	30
Gráfica 8. Conjunto de representaciones de los diferentes experimentos realizados en ensayos ecotoxicológicos	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Utilización de nanopartículas en la actualidad

Los avances tecnológicos en el campo de los nanotecnología están conllevando un rápido incremento de la utilización de nanomateriales que posiblemente se convertirán en fuente de una gran diversidad de nanopartículas de origen industrial en el entorno natural (Navarro et al, 2008a). Aplicaciones en diversas áreas económicas como la industria textil, electrónica, farmacéutica, cosmética y cerámica son sólo algunos ejemplos de los campos donde comienzan a utilizarse y que suponen una amplia red de producción y distribución de los mismos (Navarro et al, 2008a).

La inversión en este tipo de nanotecnologías en 2005 fue de 10 billones de dólares en todo el mundo, siendo estimado que este valor se incremente hasta unas cantidades cercanas al trillón de dólares en 2015, luego la apuesta por su desarrollo es una realidad actualmente. Tan sólo en 2004 se estima que se produjeron en torno a 10.000 toneladas de ENP (Engineered Nanoparticles), incluyendo no solamente sectores industriales sino también campos como la agricultura y la remediación medioambiental (Navarro et al, 2008b).

Dentro de esta amplia gama de materiales existentes, destacan por sus aplicaciones y cantidades de producción el uso de nanomateriales basados en metales como el dióxido de titanio (TiO_2) y plata (Ag). El primero de ellos sirve como protector solar y como pigmento para la producción de pinturas, mientras que la plata tiene un uso más extendido en productos de consumo gracias a su capacidad como agente antimicrobiano y sus bajos costes de producción (Osborne et al, 2013). Otros ejemplos son la utilización de nanotubos de carbono o fulerenos para la fabricación de raquetas de tenis, monitores y pantallas, e híbridos con proteínas para la producción de jabón, champú y detergente. Además en el campo de la industria de la tecnología del medio ambiente se espera con sus avances la reducción en la producción de residuos y el uso de materias primas, la disminución de contaminación industrial, la mejora de producción de agua potable y la mejora de la eficiencia de producción energética (Wiesner et al, 2006).

Las características intrínsecas de estos tipos de materiales, como su alta superficie específica, abundancia de centros activos en su superficie y alta movilidad, pueden conllevar en un futuro una serie de riesgos tanto para la salud como para el medio ambiente (Adams, Lyon, & Alvarez, 2006; He, Dorantes-Aranda, & Waite, 2012), especialmente en el caso de ambientes acuáticos, donde todavía se desconocen su comportamiento y destinos (Navarro et al, 2008b).

Todavía no existen conclusiones definitivas en cuanto a la toxicidad de los distintos nanomateriales nombrados. Los informes y publicaciones realizados hasta la fecha ponen de manifiesto la necesidad de disponer de más datos para evaluar correctamente los riesgos que pueden suponer (Aschberger et al, 2011). En principio, se considera que los efectos tóxicos de los distintos nanomateriales dependen del tamaño y la forma de los mismos, junto con sus propiedades físico-químicas, como su contenido elemental, estado de agregación/aglomeración, química superficial, etc. Se entiende que los materiales formados a base de metales como los óxidos metálicos presentan los mayores riesgos, ya que sus efectos

pueden ser debidos a las propias características de las nanopartículas o a sus correspondientes especies disueltas (Auffan et al, 2009).

El uso responsable de estos elementos manufacturados en materiales de consumo requiere un mejor conocimiento de estas características para poder caracterizarlo y conocer el alcance que pueden llegar a tener en el entorno.

1.2 Nanopartículas de plata

Algunos de los principales materiales comercializados que se utilizan en la nanotecnología son los basados en plata (Ag), siendo utilizados en numerosos productos de consumo que incluyen textiles, productos de cuidado personal, recipientes para conservación de alimentos, aditivos de lavado, electrodomésticos, productos agrícolas, pinturas y suplementos alimenticios. Aunque también están adquiriendo una especial importancia en usos relacionados con la medicina, por su uso para la fabricación de sprays antisépticos para la esterilización de aire y superficies (Xiu et al, 2012).

La producción y aplicación de las nanopartículas de plata (AgNP) en los productos de consumo es principalmente debida a sus propiedades antibacterianas, debidas a la liberación de iones plata (Ag^+) desde su superficie (Navarro et al, 2008a), que provoca su gran utilidad para muchas aplicaciones en la vida del ser humano. Sin embargo, muchos productos con plata ya habían estado siendo utilizados en el pasado, para artículos de joyería, producción de monedas, aplicaciones dentales, fabricación de espejos y recubrimientos antimicrobianos (Eckelman & Graedel, 2007).

Las principales propiedades fisico-químicas que caracterizan este tipo de nanopartículas incluyen su tamaño, la carga superficial, absorbancia en el ultravioleta-visible y la composición del revestimiento (Piccapietra, 2012).

El tamaño de partícula influye en la reactividad de la misma, definiendo su superficie específica (relación área superficial/masa) y aumentando el número de centros activos que puedan entrar en contacto con organismos o moléculas. La reactividad a estos niveles de tamaño tan pequeños es potencialmente mucho mayor que a otros tamaños de partícula superiores (Piccapietra, 2012). Además también está relacionado con la capacidad de disolución de éstas en soluciones acuosas y la liberación de iones plata (Ag^+).

La carga superficial de las nanopartículas está directamente influenciada por la composición de su recubrimiento, adquiriendo diferentes propiedades en consecuencia como capacidad de solubilización o potencial eléctrico (Piccapietra, 2012).

Debido a su carácter metálico, las nanopartículas de plata tienen además propiedades ópticas específicas. Su absorbancia es generalmente debida a la excitación o a las oscilaciones colectivas en la conducción de electrones irradiados por estímulos lumínicos (Piccapietra, 2012).

En base a todas las aplicaciones que tiene en una gran variedad de productos de consumo, es de esperar que se liberen grandes cantidades de este tipo de nanopartículas en medios acuáticos.

Siendo a su vez, por sus propiedades intrínsecas, una fuente de liberación de agregados de nanopartículas de plata y plata disuelta, que posiblemente produzcan una serie de efectos tóxicos sobre los organismos acuáticos, suponiendo por tanto una serie de riesgos para los organismos que habitan este tipo de ambientes (He, Dorantes-Aranda & Waite 2012; Navarro et al, 2008a).

1.3 Comportamiento AgNP en ambientes acuáticos

Los procesos más importantes para la biodisponibilidad de nanopartículas de plata son los de aglomeración o agregación de nanopartículas para la formación de unas de mayor tamaño, la oxidación de plata en estado de partícula (Ag (0)) a forma iónica (Ag⁺), la disolución de iones plata, la especiación y solubilización de iones plata en solución y la reacciones de modificación de la reactividad de AgNP. Las fases sólidas de mayor relevancia para la solubilización de plata en un medio son el cloruro de plata (AgCl) y sulfuro de plata (Ag₂S) (Behra et al, 2013).

Para evaluar el comportamiento que la AgNP pueda tener en un medio acuoso es esencial la cuestión de su estabilidad en función de su tamaño de partícula y su dispersión coloidal. Tamaños de NP muy pequeños son probablemente transportados en la fase acuosa, provocando una mayor facilidad para su interacción con los organismos presentes. Si el tamaño de estas nanopartículas va aumentando por acción de procesos de aglomeración, éstos se vuelven menos móviles, tendiendo a procesos de sedimentación y, por tanto, disminuyendo su biodisponibilidad para los organismos del medio, a excepción de los bentónicos y demás situados en los fondos (Behra et al, 2013). Este proceso de agregación/deposición también se ve influenciado por otros factores como la temperatura, la fuerza iónica, la concentración de partículas y el pH, entre otros (Navarro et al, 2008b).

El transporte de las partículas coloidales está determinado por procesos de convección y difusión, así como de fuerzas externas predominantes; mientras que la posibilidad de adhesiones con otras partículas o superficies está controlada por fuerzas de interacción coloidal de corta distancia (Navarro et al, 2008b).

Otro factor a tener en cuenta es la carga superficial, que depende del recubrimiento que puedan tener las nanopartículas. En estado natural, sin modificaciones artificiales, la superficie de AgNP tiene normalmente carga neta negativa a pH neutro. En cambio, si el recubrimiento contiene ácidos débiles en su superficie, la carga dependerá fuertemente del pH del medio en que se encuentre. Si la carga superficial es neutralizada como función del pH existente, se producen fenómenos de aglomeración y se favorece, finalmente, su sedimentación (Behra et al, 2013).

La disolución de AgNP implica una reacción de oxidación inicial en la superficie, pasando del estado elemental Ag (0) a forma iónica (Ag⁺), con un posible ligamiento posterior para su solubilización. El agente oxidante para la formación de iones plata suele ser el oxígeno, produciendo entonces una serie de especies reactivas oxigenadas (ROS) (Behra et al, 2013). Estas reacciones tienen una gran relevancia puesto que pueden ser las causantes de producir efectos tóxicos desde AgNP, mediante la liberación de iones plata para determinar su toxicidad, o al menos para contribuir sustancialmente a la producción de efectos biológicos adversos (He, Dorantes-Aranda & Waite, 2012).

El pH del medio no solo influye sobre las nanopartículas en cuanto a su carga superficial, sino que también los procesos de oxidación y producción de iones de plata se verán influenciados. La disolución de AgNP se ha comprobado que es más eficiente a bajos niveles de pH. Estos datos son importantes en la consideración de que para aguas naturales el pH suele oscilar en un intervalo de 6 a 8.5, mientras que en experimentación toxicológica con organismos acuáticos en medios artificiales suele estar comprendida también entre valores neutros (Xiu et al, 2012).

1.4 Interacción AgNP con organismos

Pese a toda la información sobre las características físico-químicas y las estimaciones de los posibles destinos de las nanopartículas de plata en diferentes escenarios, los posibles efectos sobre el medio ambiente y la salud humana han ido aumentando progresivamente la preocupación de la comunidad científica por su uso masivo y producción sin tener todavía un claro entendimiento de su comportamiento específico en sistemas acuáticos y biológicos. Esto es debido a que tan pronto como las AgNP son liberadas, ya sea en el aire, en aguas naturales, en medios experimentales o en fluidos biológicos, sus propiedades comienzan a modificarse y a sufrir transformaciones que influyen en su transporte, destino y posible toxicidad (Behra et al, 2013).

Los procesos de transformación se deben en muchas ocasiones a la interacción biológica con organismos del medio donde se encuentran. Esta interacción puede ser fomentada por la presencia de ligandos bióticos liberados en el medio con la presencia de las nanopartículas, produciendo un incremento de la disolución de dichas partículas y aumentando su biodisponibilidad. El tamaño de las mismas juega un papel crucial en estos procesos, puesto que para tamaños más pequeños la disolución es un proceso más rápido y se produce un aumento en el consumo de las nanopartículas por parte de los organismos (Behra et al, 2013).

Este consumo se puede definir como la penetración de las nanopartículas (o las especies disueltas) en la célula del organismo, teniendo tres mecanismos principales para este proceso: a través de microporos de la pared celular (caso de hongos, plantas y algas) o de la membrana celular, por endocitosis, por canales iónicos o portadores de proteínas. En el caso del primer mecanismo, la existencia de una pared celular supone una barrera inicial para impedir la entrada de cualquier sustancia en la célula. Sin embargo para unos determinados tamaños, comprendidos entre 5 y 20 nm, existen microporos por los que pueden penetrar en el organismo. De esta manera se espera que AgNP y ciertos agregados de nanopartículas puedan pasar por estos poros y se pongan en contacto con la membrana plasmática interior (Navarro et al, 2008b).

La interacción que ya en su interior se produce puede llevar a la formación de un número mayor de poros de mayor tamaño, que finalmente suponga la entrada de una mayor cantidad de NPs. En los procesos de endocitosis, la membrana plasmática forma una estructura en forma de cavidad que rodea la nanopartícula, provocando finalmente su ingestión al interior de la célula. En cualquiera de estos casos, una vez entra en la célula, ésta puede ligarse con los distintos tipos de orgánulos que la componen e interferir en sus procesos metabólicos (Navarro et al, 2008b).

1.5 Ecotoxicidad de AgNP

Los estudios sobre los efectos adversos que pueden observarse por la presencia de nanopartículas de plata son escasos, siendo en su mayoría realizados sobre algas, plantas u hongos.

Dentro de los efectos producidos, se diferencia entre directos e indirectos. Los efectos directos que pueden producir estarán determinados principalmente por su composición química y su reactividad superficial, actuando en muchas ocasiones como catalizadores de reacciones redox. Su elevada área superficial produce la presencia de gran cantidad de centros activos de la partícula que conducen a una mayor reactividad con los organismos presentes. La penetración de AgNP en las paredes celulares y membranas produce unos impactos sobre procesos fotosintéticos y respiratorios que se producen en su interior (He, Dorantes-Aranda & Waite, 2012).

Además también se ha observado que provocan alteraciones en las membranas celulares, con incrementos anómalos de su porosidad, interrumpiendo la capacidad celular para la regulación del transporte a través de la membrana (Navarro et al, 2008b). Este incremento de la porosidad también se traduce en un incremento de la entrada de NP en la célula.

Por otro lado, se observan otros efectos indirectos como las restricciones físicas, debidos principalmente a la liberación de iones tóxicos y la producción de especies oxigenadas reactivas. Además, también pueden tener funciones como portadores de otros contaminantes, aumentando o reduciendo la biodisponibilidad de otras sustancias tóxicas.

Dentro de las restricciones físicas como efecto producido, un ejemplo importante es que la acumulación de AgNP en superficies de organismos fotosintéticos pueden inhibir la actividad fotosintética de los mismos por cuestiones de efecto sombra. Esto es debido a la reducción de la luz disponible, más que a la propia toxicidad de las nanopartículas en sí. Aunque el efecto que puedan producir las AgNP sobre los rendimientos fotosintéticos parece ser mucho menos relevante que el que puedan causar los iones de plata liberados según los resultados de Navarro et al. (2008a). Estos iones producen efectos como la inhibición de enzimas respiratorias y la inducción de situaciones de estrés oxidativo bajo la generación de especies oxigenadas reactivas. Como consecuencia se producen reducciones en el crecimiento celular y disminuciones en lo rendimientos de la fotosíntesis (Navarro et al, 2008b).

Por otro lado, también existen efectos positivos inducidos por la interacción entre nanopartículas de plata y organismos vivos. Debido a sus propiedades antimicrobianas, se pueden ver favorecidos procesos de germinación y crecimientos más vigorosos, además de aumentar la fuerza y resistencia de plantas a situaciones de estrés. Al mismo tiempo, las AgNP pueden contener nutrientes en sus superficies que pueden ser esenciales para el crecimiento del organismo, así como se habló de portadores de contaminantes, debido a su alta reactividad y a su índice de superficie específica (Navarro et al, 2008b).

1.6 Aproximación experimental propuesta

La temática de los estudios sobre el comportamiento y la caracterización de las nanopartículas es todavía reciente, existiendo aún muchas incógnitas por resolver (Navarro et al, 2008a).

Sin embargo lo que es seguro es la relevancia de este tipo de estudios, dado el ritmo de llegada al mercado de productos que contienen nanomateriales. Dichos productos, al final de su vida útil o a lo largo de su uso, liberarán los nanomateriales en el medio ambiente, donde todavía se desconocen la mayor parte de sus efectos sobre la salud humana y ambiental (Navarro et al, 2008; Xiu, Zhang, Puppala, Colvin, & Alvarez, 2012).

Para conocer el potencial tóxico de las nanopartículas de plata, es esencial entender su comportamiento químico y biológico. Otro de los principales puntos de relevancia es conocer las cantidades de plata que se pueden verter sobre el medio ambiente desde los productos de consumo en los que están presentes.

En este proyecto se pretende abordar el estudio de las interacciones de las AgNP en uno de los productos de consumo más comercializados que utilizan este tipo de tecnología, los recipientes de almacenamiento de comida. El material desde donde se liberan las nanopartículas de plata a estudiar corresponden un tipo específico de envases de plástico (Kinetic Go Green, Kinetic a Division of Pathway, Iowa, EEUU, (Echegoyen & Nerín, 2013)) de uso comercial que utiliza este nanomaterial para favorecer el estado de conservación de los alimentos en su interior gracias a sus propiedades antibacterianas.

Para ello se medirán las concentraciones de plata mediante dos tipos de procedimientos: uno basado en la química analítica (mediante el uso de Induced Coupled Plamas – Mass Spectroscopy *ICP-MS*); y mediante el uso de biosensores (la fotosíntesis del alga *Chlamydomonas reinhardtii*). Para ello se aprenderán técnicas de cultivo algal y se pondrán a punto técnicas de ecotoxicología que permitan exponer a las algas a la plata potencialmente liberada desde los envases de uso alimentario.

Este trabajo, a pesar de realizarse en el laboratorio, persigue el desarrollo de nuevas técnicas que mejoren la evaluación de riesgos asociados a la inclusión de nanomateriales en productos de consumo y que potencialmente pueden ser liberados al medio ambiente.

2. OBJETIVOS

El objetivo general es caracterizar la liberación de plata desde recipientes de plástico de uso alimentario que contienen nanopartículas de plata. Este objetivo general se divide en dos objetivos específicos:

1. Caracterización de la liberación de plata desde el recipiente de plástico hacia un medio líquido en contacto con él, utilizando la técnica de ICP-MS (Plasma de Acoplamiento Inductivo con detector de Espectrometría de Masas). Se estudiará como diferentes condiciones (cambios en el pH y la temperatura) afectan a dicha liberación.
2. Utilizando los medios líquidos anteriores, se estimará la plata biodisponible basándonos en la toxicidad de la misma sobre la fotosíntesis de cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Ensayos ecotoxicológicos

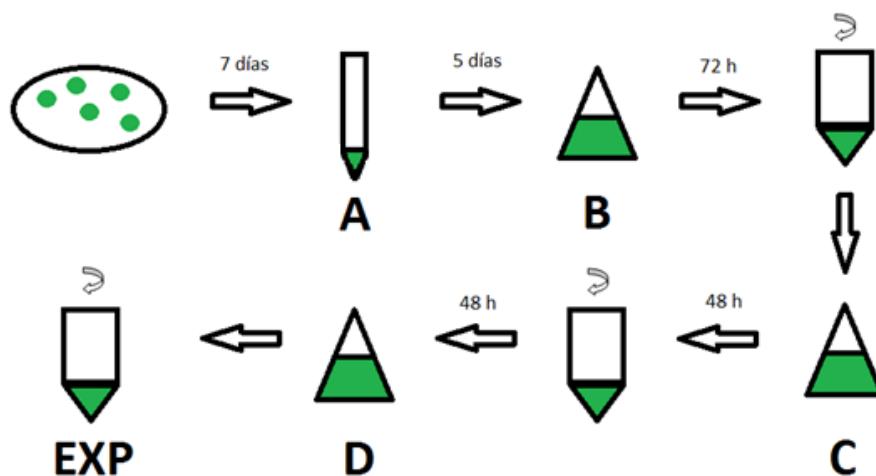
3.1.1. Cultivos algales

Los ensayos ecotoxicológicos realizados para el estudio de la liberación de plata desde recipientes de plástico de uso alimentario con nanopartículas de plata se llevaron a cabo mediante el uso de algas como biosensores. Estas algas pertenecen a la especie de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii*, seleccionadas por su extendida utilización en ensayos de toxicología.

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga verde eucarionte, empleada como modelo desde hace varias décadas en estudios fisiológicos como la fotosíntesis, la formación de cloroplastos y la función de los flagelos. Su facilidad de manipulación así como su rápida multiplicación la convierten en una especie ideal para su uso en cultivos de laboratorio. Presenta una morfología ovoide de aproximadamente 10 micrómetros de largo por 3 de ancho, siendo la mayor parte de su espacio intracelular ocupado por un único cloroplasto encargado de la fotosíntesis.

Los cultivos que se realizaron para los ensayos requieren una serie de tratamientos recogidos en diferentes etapas hasta la obtención de un cultivo final en unas condiciones idóneas para su experimentación posterior. El conjunto de las etapas supone un proceso de dos semanas de duración, partiendo inicialmente de un cultivo “madre” realizado en una placa Petri que contiene un medio sólido de agar y nutrientes, sobre los cuales crecen las algas.

A continuación se muestra un gráfico informativo con las condiciones distribuidas por etapas para los cultivos de algas, con una descripción de cada una de ellas:



Fotografía 1. Etapas de cultivo de algas para experimentación

- Cultivo A

Se prepara a partir del cultivo “madre” tras siete días en incubadora. Se trasvasan las colonias de algas a un tubo de ensayo de 10 ml, que contiene 5 ml de talaquil en su interior.

El talaquil es un medio de crecimiento que contiene sales y nutrientes, permitiendo además el intercambio gaseoso en su interior.

- Cultivo B

Tras un periodo de en torno a 3 o 5 días, se prepara el cultivo B. Esta vez el envase donde se depositan las algas es en un erlenmeyer de 100 ml, que contiene en su interior 50 ml de talaquil, a lo que se le añaden 100 μ l de algas de la solución A. Se deja en incubadora durante dos o tres días hasta la preparación del siguiente medio de cultivo.

- Cultivo C

Para su preparación, primero se traspasa toda la solución a un tubo Falcon, que será centrifugado bajo unas condiciones de 3000 rpm (1275 Gs) durante 10 minutos. Posteriormente se retira el sobrenadante, que consiste en el propio medio de talaquil, hasta que únicamente queden las algas sedimentadas al fondo del Falcon.

Una vez realizado este proceso, se mide la concentración de algas de la solución restante mediante espectrofotometría en el visible, a una longitud de onda de 685 nm. Para la medida en el equipo es necesaria una dilución previa 1:30 en la cubeta donde se va a medir la solución con algas. La respuesta del equipo recibida, llamada OD (Densidad Óptica), se relaciona directamente con la concentración de algas.

La concentración de algas necesaria para el siguiente paso, se corresponde con una OD de 0.05. Este volumen de algas se dispone luego en un erlenmeyer de 100 ml, que también contendrá 50 ml de talaquil.

- Cultivo D

Tras dos o tres días de la preparación del cultivo C, se prepara esta nueva solución. El proceso vuelve a constar de una centrifugación en las mismas condiciones que el caso anterior, con su correspondiente retirada del sobrenadante. Se vuelven a medir en espectrofotometría en visible (685 nm), calculando el volumen necesario de algas para obtener una concentración correspondiente a una OD de 0.05. Este volumen de algas se traspasa a un erlenmeyer de 250 ml que contiene 150 ml de talaquil.

- Cultivo EXP

Correspondiente al cultivo de experimentación, se prepara el mismo día que se quiere realizar un ensayo, para que las algas contenidas estén en las mejores condiciones posibles. El procedimiento es el mismo que para los cultivos C y D. Se prepara tras dos o tres días de dejar en la incubadora el cultivo D. En este caso no se dispone de un medio final de talaquil, sino que comprende solamente las algas en un medio acuoso tamponado (MOPS 10 mM), que permite la exposición de las mismas en condiciones químicas controladas.

El volumen final en que se disponen las algas es de 6 ml, y la OD corresponde a un valor de 0.15 a una longitud de onda de 685 nm. Este medio de cultivo será el que se utilice para las experimentaciones a realizar en los ensayos toxicológicos.

3.1.2. Calibración de la respuesta fotosintética a la plata

En cada experimento, para realizar los test del rendimiento de la fotosíntesis de los cultivos algales, se preparan una serie de soluciones con AgNO_3 de molaridad conocida que servirá como calibración para estimar posteriores cantidades de plata en las soluciones con nanopartículas en función de estos resultados, tratados en las curvas dosis-respuesta.

Para cada experimento la molaridad de estos patrones utilizados varía, aunque siempre se encuentran en un rango entre 0 nM (controles) y 4500 nM. Estos valores se han ido determinando conforme a los resultados experimentales previos.

Los estándares o patrones, se prepararon a partir de nitrato de plata con una riqueza del 99%, preparando a partir de esta sal una solución madre de nitrato de plata de 10 mM. De ésta se prepararon posteriormente otras soluciones intermedias con las que trabajar en los ensayos de una molaridad 10 μM . Los enrasamientos correspondientes a la hora de la preparación de las soluciones se realizaron con agua miliQ.

3.1.3. Muestras de AgNP procedentes de envases de uso alimentario

La plata nanoparticulada con la que se realiza la experimentación toxicológica procede de los recipientes de plástico de conservación de alimentos Kinetic Go Green (13 cm x 9 cm x 4cm). Para poder experimentar con ella es necesario un periodo de liberación desde la matriz, recogida en medio MOPS (agua ultrapura tamponada con MOPS 10 mM). Este medio no contiene nutrientes en su interior, que puedan interferir con las experimentaciones que se quieran realizar, teniendo además capacidad de tampón para el mantenimiento de un determinado pH en su interior, y será con el que realicen también las experimentaciones ecotoxicológicas con las algas.



Fotografía 2. Envase de plástico Kinetic Go Green

Se diseñó un protocolo de trabajo que maximizara la cantidad de plata potencialmente liberada, por unidad de volumen de medio en contacto con el recipiente.

Esto conlleva que los volúmenes sean tan reducidos en relación con el plástico con el que está en contacto que no pueden utilizarse los envases enteros en una solución de medio, sino que es necesario cortar el envase en fragmentos de plástico, y así maximizar la superficie de plástico en contacto con el medio en el que luego se expondrán las algas.

Estos fragmentos se disponen en tubos Falcon con el medio en una gradilla y se mantiene en agitación orbital durante días en condiciones de laboratorio (sin luz y a 25° C). En general este proceso dura unas dos semanas.

Una vez se quiere realizar el ensayo correspondiente, antes de la exposición del medio con las algas se retiran los fragmentos de plástico. Estas soluciones son las denominadas “soluciones problema” de las que se quiere medir la cantidad liberada de plata mediante el uso de las algas como biosensores.

3.1.4. Ensayos: técnica fluorométrica

La técnica analítica empleada durante los ensayos toxicológicos es la espectrometría de fluorescencia o fluorometría. Consiste en la medición de los rendimientos fotosintéticos de las muestras con algas, preparados en cubetas, comparando los niveles basales con los niveles tras una excitación de electrones mediante un haz de luz, en el fotosistema II de las algas, que produce una absorción del impulso lumínico recibido. El parámetro obtenido (Yield) refleja la eficiencia del proceso de conversión de energía fotoquímica de las algas.

El equipo para ello utilizado es MINI-PAM II (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Baviera, Alemania). Las mediciones de cada muestra se realizan por triplicado.



Fotografía 3. MINI-PAM II (derecha) junto con muestras de plata con algas, dispuestas para ensayo

Pese a que el procedimiento de los experimentos es el mismo en cuanto a la técnica analítica se refiere, sí que se distinguen dos etapas durante los ensayos toxicológicos: una de pre-experimentación y otra de experimentación final. Durante la primera solo se trabajó con nitrato de plata a modo de calibración para la determinación de las condiciones idóneas en las que se ven unos efectos de la plata sobre las algas, teniendo en cuenta pH, concentraciones, tiempo de exposición, etc. Además también tiene la finalidad de la iniciación en la realización de curvas dosis-respuesta para optimizar el proceso en experimentos posteriores. Finalmente se realizaron una serie de experimentos finales en los cuales las condiciones ya han sido determinadas y con las que se comienza a trabajar con las soluciones que contienen nanopartículas de plata de concentración desconocida.

- Pre-experimentación

Pre-experimento 1: dosis respuesta con AgNO₃

El objetivo de este primer pre-experimento es la realización de un ensayo de toxicología donde las algas están expuestas a unas concentraciones de plata predeterminadas por medio de unos patrones de nitrato de plata. De este modo, se pretende obtener un primer acercamiento a cómo se obtiene una curva dosis-respuesta y ver la influencia del aumento de las concentraciones de plata en el rendimiento de la fotosíntesis de las algas. Además, también se tiene en cuenta el factor tiempo de exposición, puesto que se tomaron medidas a una y dos horas de exposición. El medio en el que se realiza es en MOPS (10 mM), a pH 7.5.

Las cantidades de nitrato de plata de las soluciones estándar se expresan en nM, y comprenden desde 0 (casos control) hasta 3000 nM.

Pre-experimento 2: test de comportamiento de algas a variación de pH

Este ensayo consiste en ver cómo las variaciones a distintos pH pueden afectar al rendimiento fotosintético de las algas. Las soluciones a medir no tienen en ningún caso plata alguna, consistiendo únicamente en un volumen determinado de MOPS con algas en solución. Con ello se pretende estudiar cuál es el pH más bajo que pueden soportar las algas sin unas variaciones relevantes de su capacidad fotosintética, puesto que cuanto más ácidas sean las condiciones del medio más plata iónica se libera, siendo un factor clave para experimentos posteriores con nanopartículas de plata, donde se desea la presencia de la mayor cantidad posible de esta especie.

La preparación de las soluciones de MOPS a distintos valores de pH se realiza con ácido clorhídrico para su acidificación, e hidróxido de potasio para basificarlo. Los valores de pH se controlan con medidas directas en pH-metro, siempre modificando sus valores antes de la presencia de algas en las soluciones.

El rango de pH de este ensayo va desde 5.5 hasta 7.5, tomando como datos de control los de pH 7.5 puesto que se conoce que para este valor no hay efecto alguno en la fotosíntesis algal, y todos los resultados se normalizan en función de éstos.

Pre-experimento 3: dosis-respuesta a varios pH

El objetivo de este ensayo es la comparación de las curvas dosis-respuesta de los rendimientos de fotosíntesis entre pH 5.5 y 7.5, para comprobar si hay variaciones en el comportamiento de cómo se ven afectadas las algas por la plata en dichas condiciones.

Las distintas soluciones de plata se preparan con nitrato de plata en concentraciones conocidas, a modo de estándares. Sin embargo, en este caso se preparan dos soluciones distintas por cada cantidad de AgNO₃ añadida, puesto que estarán a un pH distinto de MOPS. Las modificaciones de los pH se realizan del mismo modo que en el pre-experimento 2.

Las molaridades de la recta de calibración comprenden valores desde 0 hasta 3000 nM.

- Experimentos finales

Una vez determinadas las condiciones idóneas para la experimentación a través de los ensayos denominados como pre-experimentos, se procede a la realización de ensayos con muestras que contienen nanopartículas de plata. Para ello se realizaron unas estimaciones previas, calculando cual sería la cantidad de plata liberada en función de la superficie de plástico empleada para su migración en el medio. Según un estudio de liberación de plata realizado en el mismo tipo de envase que en el utilizado en este trabajo, Kinetic Go Green, mediante unas digestiones ácidas se conseguía un ratio de migración de 0.39 mg/cm^2 de plata total (Echegoyen & Nerín 2013). Con los datos aportados en este estudio, y mediante las correcciones realizadas durante los experimentos a partir de resultados que se iban obteniendo, se buscaron unos valores óptimos en cuanto a la cantidad de plata liberada para conseguir ver de forma clara un efecto de la plata sobre la fotosíntesis de las algas, siempre mediante estimaciones que se comprobarían con las medidas posteriores de las muestras en ICP-MS.

Durante estos experimentos se compararon parámetros como el pH, el tiempo de exposición con algas y la utilización de microondas sobre las muestras con AgNP para ver su influencia sobre la liberación de plata. Los niveles de pH escogidos fueron 5.5 y 7.5; la utilización de microondas se realizó mediante el calentamiento de las muestras a 700 W, durante 2 minutos (Echegoyen & Nerín 2013); y los tiempos de exposición fueron, dependiendo del experimento a 1, 2 y 3 horas desde que se añadieron las algas a las soluciones.

Cabe destacar que el procedimiento de calentamiento de las muestras con microondas varió durante las experimentaciones. Durante los tres primeros experimentos, se calentaron las muestras justo antes de la experimentación, con los fragmentos de plástico correspondientes en su interior, sin haberlos dejado previamente en la incubadora para la liberación de plata. A partir del experimento 4, inclusive, el calentamiento se realizó tras dejar las muestras liberando plata por 2 semanas, como las muestras sin dicho calentamiento.

Experimento 1: dosis-respuesta con 21 fragmentos de Kinetic Go Green (21 NP)

Para la realización de este ensayo ecotoxicológico se utilizaron, por solución de muestra con nanopartículas, 21 fragmentos de plástico de $0.4 \times 0.4 \text{ cm}$. En total la superficie de plástico expuesto fue de 9.92 cm^2 , en un volumen de 8 ml de MOPS, a distintos pH. De estos 8 ml, dos se utilizaron para posteriores medidas en ICP-MS, mientras que el volumen final de experimentación toxicológica fue de 6 ml. En total se prepararon cuatro muestras: dos a pH 5.5 y dos a 7.5, diferenciando entre ellas por calentamiento directo en microondas y por liberación de plata en MOPS durante 2 semanas en incubadora.

La recta de calibración correspondiente con soluciones de concentración conocida de nitrato de plata comprendieron rangos desde 0 hasta 3000 nM.

Experimento 2: dosis-respuesta 3 NP

Este experimento corresponde al estudio de la comparación entre los efectos debidos a muestra con plata nanoparticulada liberada por calentamiento con microondas y un control

sin plata en su interior, también calentado. De este modo se estudia si se favorece la liberación de plata mediante este procedimiento.

Las nanopartículas de plata proceden de 3 fragmentos de plástico de dimensiones de 1.5 x 1.5 cm, con una superficie de exposición de 13.05 cm².

Las condiciones de las muestras problema son de pH 5.5 tratada con microondas a 700W durante 2 minutos. Los resultados se recogen a 1, 2 y 3 horas.

Experimento 3: dosis-respuesta comparativa 3 y 6 NP

El objetivo es la comparación entre los efectos que la plata produce en las algas, siendo la cantidad de exposición diferente, al añadir para unas soluciones 3 fragmentos de plástico y en otros 6 fragmentos. Además entre los casos de soluciones con 6 fragmentos se distinguió entre calentamiento con microondas o sin fase de calentamiento, mientras que para el caso de 3 fragmentos únicamente se preparó la muestra sin calentamiento alguno.

Las dimensiones de los fragmentos son de 1.5 x 1.5 cm², variando el número que se introdujeron para la liberación de plata. La superficie que supusieron de exposición con el MOPS fue de 13.05 y 28.35 cm², para el de 3 fragmentos y el de 6. El pH del medio donde se realizaron los test fue a pH 5.5, en 8 ml de volumen. El test de toxicidad se llevó a cabo en 6 ml. El experimento se realizó únicamente tras una hora de exposición de las algas con la plata.

Experimento 4: dosis-respuesta comparativa 9 y 12 NP

Las cantidades de fragmentos de plástico se aumentaron para este ensayo hasta 9 y 12. Los volúmenes de medio de exposición así como su pH no variaron respecto al experimento número 3, modificando únicamente las superficies de exposición del plástico al aumentar el número de trozos de plástico, con valores de 43.65 y 58.95 cm². Las muestras con AgNP se calentaron todas con microondas.

Los tiempos de exposición fueron de 1, 2 y 3 horas.

Experimento 5: dosis-respuesta con base de Kinetic Go Green

En esta ocasión se utilizó toda la base de uno de los recipientes de conserva de alimentos (140 cm²) con MOPS en su interior para la liberación de plata en un volumen de 40 ml, el necesario para sumergir dicha superficie. El pH del medio fue de 5.5 para todos los casos, diferenciando si se usó o no calentamiento con microondas de las muestras. En función del procedimiento se hicieron dos réplicas de las muestras, ascendiendo a un número total de 4 muestras para el ensayo, que se realizó en volúmenes de 6 ml con algas.

Los tiempos de exposición fueron de 1, 2 y 3 horas.

Experimento 6: dosis-respuesta con 56 NP

Las dimensiones de los fragmentos de plástico utilizado por solución varían a partir de este experimento, siendo de 0.75 x 0.75 cm. Este cambio se produce por un intento de aumentar la cantidad de superficie de contacto con el medio (MOPS, a pH 5.5) sin tener que modificar el volumen empleado para la liberación (8 ml).

Con este cambio se añadieron 56 fragmentos, que supone una superficie de unos 80 cm². Las soluciones problema fueron dos, una calentada con microondas y otra sin.

Los tiempos de exposición fueron de 1, 2 y 3 horas.

Experimento 7: dosis-respuesta con 64 NP

Con las mismas dimensiones que el experimento anterior, 0.75 x 0.75 cm, se añadieron esta vez 64 fragmentos, con una superficie de liberación total de 90 cm². Otra modificación fue que la recta de calibración con nitrato de plata fue preparada en un rango de concentraciones desde los casos control hasta 4500 nM.

Los tiempos de exposición fueron de 1, 2 y 3 horas.

3.1.5. Curva dosis-respuesta

Los datos de los rendimientos fotosintéticos obtenidos en la experimentación fueron representados en forma de porcentaje de sus respectivos controles, a modo de normalización. Una vez filtrados los datos relevantes y clasificados en función de pH, tiempos de exposición, cantidad de plata (para datos de recta de calibración) y su correspondiente Yield, fueron procesados mediante el programa estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, 2011) para la realización de la curva dosis-respuesta. Con ello se puede observar la tendencia del rendimiento fotosintético de las algas respecto a un incremento de las concentraciones de plata en el medio. R permite el cálculo de una serie de estadísticos y parámetros que aportan información sobre los resultados obtenidos, aunque la curva dosis-respuesta en sí se realiza de acuerdo a un paquete interno del propio programa, “drc”.

Este paquete proporciona una función de cuatro parámetros log-logísticos, de acuerdo con una serie de argumentos internos, que permite el cálculo de las concentraciones de plata en función del rendimiento fotosintético obtenido. De este modo la representación de los resultados para cada experimento servirá para un cálculo estimado de las concentraciones que representan las muestras con nanopartículas, que son de concentración desconocida. Además permite el cálculo de la EC₅₀, parámetro referido a la concentración de la plata a la cual induce una respuesta en el rendimiento de la fotosíntesis entre mitad de la línea de valores basales y los valores máximos tras un tiempo de exposición determinado.

Un ejemplo de curva dosis-respuesta se muestra a continuación:

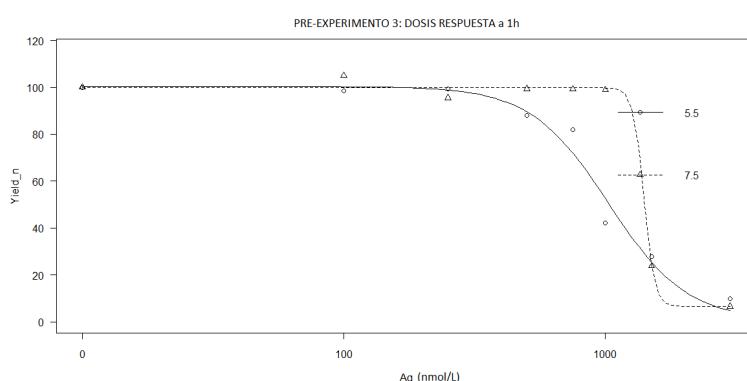


Figura 1. Ejemplo de dosis-respuesta, obtenida con programa R

El ajuste de las gráficas dosis-respuesta se realizó de acuerdo a funciones de decrecimiento exponencial en orden de curvas logísticas de cuatro parámetros, correspondientes a valores de los máximos, mínimos, EC₅₀ y pendiente de las rectas. Estos parámetros sirven para el cálculo de las concentraciones de plata de las soluciones desconocidas, a partir de una señal (yield), mediante la siguiente ecuación:

$$f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

Donde b es la pendiente de la recta, c es el valor mínimo que alcanza la curva, d es el máximo y e es la EC₅₀. Todos estos valores son aportados por el propio programa al realizar la dosis-respuesta, caracterizándola para cada tiempo de exposición de las algas con la plata.

3.2. Análisis mediante ICP-MS

A lo largo de todos los ensayos de toxicología realizados con nanopartículas de plata, se fueron preparando una serie de muestras a partir de dichas soluciones, para ser medidas las cantidades de plata que contienen, y así dar un mayor rigor a los datos experimentales finales testados con las algas con el fin de conocer la cantidad plata liberada de manera más exacta. De este modo se explica las diferencias de volúmenes durante los ensayos, puesto que para la liberación de plata se realizaron en 8 ml de MOPS, mientras que para la experimentación tan solo se utilizaban 6 ml de cada solución. La diferencia de 2 ml fue lo que se recogió de cada una de ellas para ser analizada por medio de la técnica analítica de Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry *ICP-MS*.

Las muestras a analizar no solo correspondieron a las soluciones de concentración desconocida con nanopartículas, sino también a controles utilizados durante ensayos y a estándares utilizados para realizar rectas de calibración con nitrato de plata.

3.2.1. Preparación muestras

Para evitar posibles daños en el equipo debidos a la matriz en la que se encuentran y conseguir mejores valores de reproducibilidad y exactitud, antes de la medida de las muestras en ICP es necesario un tratamiento previo de las mismas. Esto supone cambiar el medio en que se encuentran, MOPS a un determinado pH, por ácido nítrico al 1%. Para ello, las muestras fueron pesadas y trasvasadas a viales de vidrio, anotando su peso correspondiente para trabajar sobre datos en masa y no en volumen, y así mejorar la exactitud de los cálculos posteriores de las concentraciones de las muestras medidas.

Una vez en los viales, se depositaban sobre una placa calefactora a 110°C para su evaporación hasta sequedad. Despues se les añadía 2 ml de ácido nítrico al 1% para digerir el contenido de la plata en los viales y se mantuvieron en contacto durante diez minutos. La elección de este ácido se debe a la solubilidad de todos los nitratos así como su capacidad oxidante y las pocas interferencias químicas y espectrales que presenta. Se utiliza un ácido nítrico ultrapuro para análisis de trazas. Por último se depositó el contenido en unos viales de polietileno de baja densidad, para evitar la posible adhesión de los metales en las paredes que sí tiene lugar en los recipientes de vidrio.

3.2.2. Medida en ICP-MS

El Plasma de Acoplamiento Inductivo con detector de Espectrometría de Masas es una técnica analítica que permite la determinación de las concentraciones de plata contenidas en las muestras a analizar. Las muestras son introducidas en el equipo, de forma que el nebulizador (tipo babington) forma un aerosol con ellas para que los componentes sean posteriormente atomizados e ionizados en un plasma de argón, a una temperatura de hasta 410.000°C.

Los iones producidos son separados en base a su relación carga/masa en el espectrómetro de masas, para ser posteriormente cuantificados por un detector, que emite una señal en función de los impactos recibidos por segundo (cuentas/segundo). Dentro de las opciones del equipo se escoge que las mediciones realizadas sean únicamente de plata como elemento a una determinada masa atómica de 107 u.

Antes de la introducción de las muestras se realiza una recta de calibración con plata a partir de una disolución patrón de Ag (I) de $1000 \pm 2 \text{ mg/l}$ (Fluka), que comprende valores de molaridad desde 5 hasta 5000 nM, más el correspondiente blanco sin plata, preparados en ácido nítrico al 1%. Parámetros del equipo como la posición de la antorcha, el flujo del gas nebulizador y el voltaje de las lentes fueron optimizados antes del análisis.



Fotografía 4. Equipo ICP-MS, localizado en el CPS (Zaragoza)

Los parámetros de adquisición de datos fueron de 0.1 segundos de integración por punto, con 10 repeticiones de medida. El blanco fue medido 5 veces, las muestras se midieron por triplicado.

3.2.3. Determinación de concentraciones de las muestras

Los datos de las señales recibidas durante el proceso de medida de las muestras en el espectrómetro se obtienen en “cuentas por segundo”. Estos datos permiten, mediante los de la recta de calibración con estándares de concentración conocida, el cálculo de las concentraciones correspondientes de plata de cada muestra mediante interpolación de los resultados.

Estas concentraciones relacionadas con los pesos de las muestras originales antes de ser tratadas con ácido nítrico permiten conocer la cantidad exacta de plata para los volúmenes de medio en que se recogieron durante los ensayos de toxicidad.

3.3. Tratamiento estadístico

Todos los errores son expresados como desviaciones típicas, excepto para los parámetros de las EC₅₀, que se expresan como errores estándar.

Las relaciones entre distintos parámetros específicos calculados se realiza mediante el cálculo del p-valor, reflejando diferencias significativas para valores menores a 0.05 ($p < 0.05$). Las diferencias entre los tratamientos realizados en los ensayos fueron comparadas a partir del método ANOVA, consistente en análisis de la varianza, para observar diferencias significativas en algunas variables como el pH del medio de experimentación o la utilización de microondas en las muestras.

Para la aplicación de este método es necesario descartar los valores atípicos previamente, clasificándolos en función de determinadas variables en la experimentación. El análisis de los datos se realiza mediante el programa Excel, en la modalidad de factor único o de doble factor con réplicas en función del número de variables en los que se encuentren clasificados. Finalmente, el análisis comparativo se estudia mediante los resultados del p-valor.

Además, se ha empleado una metodología que mediante el cálculo de cuartiles para un rango de datos permite la desestimación de valores atípicos u *outliers* en ellos. De este modo se hace una selección de los datos representativos, sin que puedan interferir algunos que por determinadas circunstancias puedan desvirtuar los resultados finales. Para la detección de estos valores *outliers* se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\text{Límite inferior} = Q_1 - 1.5(Q_3 - Q_1)$$

$$\text{Límite superior} = Q_3 + 1.5(Q_3 - Q_1)$$

Estas fórmulas hacen referencia a los límites para los cuales se determinan los datos desecharables, siendo considerados de tal modo si están por debajo del límite inferior o por encima del superior. Las Q's son los cuartiles calculados mediante el programa Excel, haciendo referencia con los subíndices numéricos al cuartil al que corresponde.

4. RESULTADOS PRE-EXPERIMENTACIÓN

Pre-experimento 1: dosis respuesta con AgNO₃

La figura 2 muestra la representación de los valores obtenidos experimentalmente, observándose el comportamiento de la capacidad de fotosíntesis de las algas en función de concentraciones crecientes de plata en el medio. En la misma se muestra dos curvas, una tras una hora de exposición de las algas con la plata y tras dos horas. Los valores de concentraciones de plata se deben exclusivamente a las soluciones estándar preparadas con de nitrato de plata.

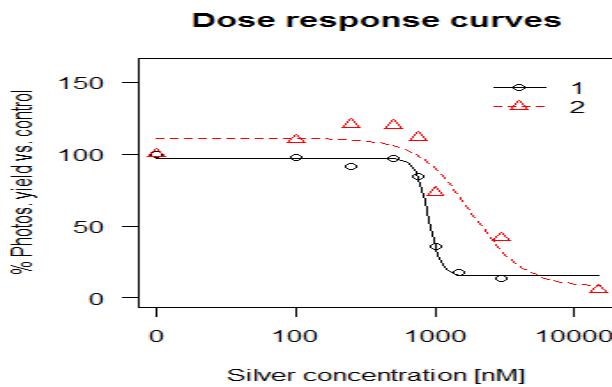


Figura 2. Curvas dosis-respuesta pertenecientes al pre-experimento 1, con AgNO_3 , a 1 y 2 horas

Los valores de las EC_{50} para 1 y 2 horas son de 892.9 ± 74.9 y 1828.2 ± 716.6 nM, respectivamente. Estos valores permiten estimar las concentraciones sobre las cuales los efectos empiezan a ser relevantes para las funciones de fotosíntesis. La comparativa entre estos valores se realiza mediante el cálculo del p-valor, con un resultado de 0.0122.

Observando ambas curvas se comprueba que pese a que se muestra un efecto tóxico que afecta a la capacidad de las algas, éste se muestra en menores concentraciones a una hora de exposición que a la segunda hora, reflejado en los valores de las EC_{50} . La caída de los rendimientos también lo demuestra, presenciándose la caída de la curva a mayores concentraciones en la segunda hora, y con una tendencia no tan pronunciada como en el primer caso.

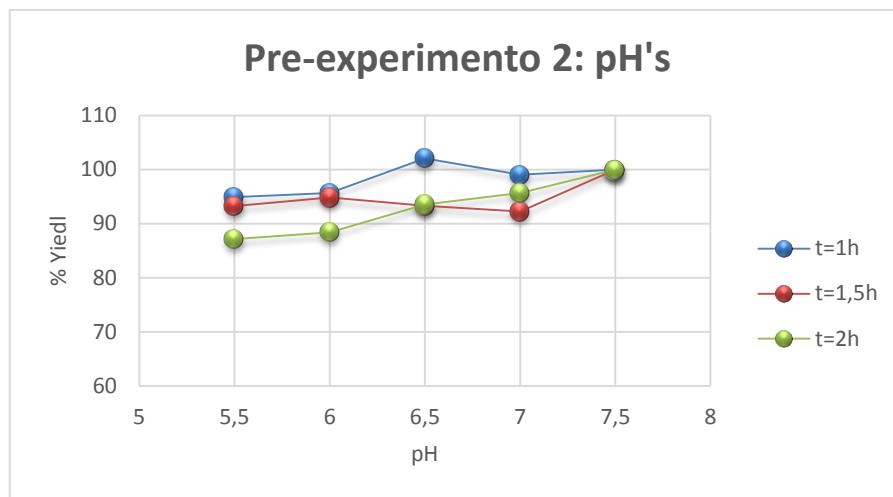
Pre-experimento 2: test de comportamiento de algas a variación de pH

Los resultados de los porcentajes de los rendimientos normalizados para cada pH estudiado se recogen en la tabla 1, mostrando el valor promedio entre las repeticiones para cada muestra, junto con las desviaciones típicas. Estos datos se han calculado respecto a los controles, que en este caso se consideraron como a los de los rendimientos a pH 7.5, donde se conoce que no hay afecciones sobre las algas.

pH	Yield (%)		
	1h	2h	3h
7.5	100 ± 8.5	100 ± 5.8	100 ± 6.4
7	99.1 ± 4.7	92.3 ± 5.7	95.7 ± 2.5
6.5	102.1 ± 9.8	93.3 ± 1.6	93.6 ± 9.7
6	95.7 ± 1.9	94.9 ± 2.4	88.4 ± 16.4
5.5	94.9 ± 8.4	93.3 ± 5.4	87.1 ± 8.8

Tabla 1. Porcentajes de Yield normalizado, expresados en función del pH correspondiente y su tiempo de exposición con algas

El conjunto de datos se muestra gráficamente (gráfica 1), donde se puede comprobar si hay efectos en la capacidad fotosintética de las algas en función para cada nivel de pH en función del tiempo.



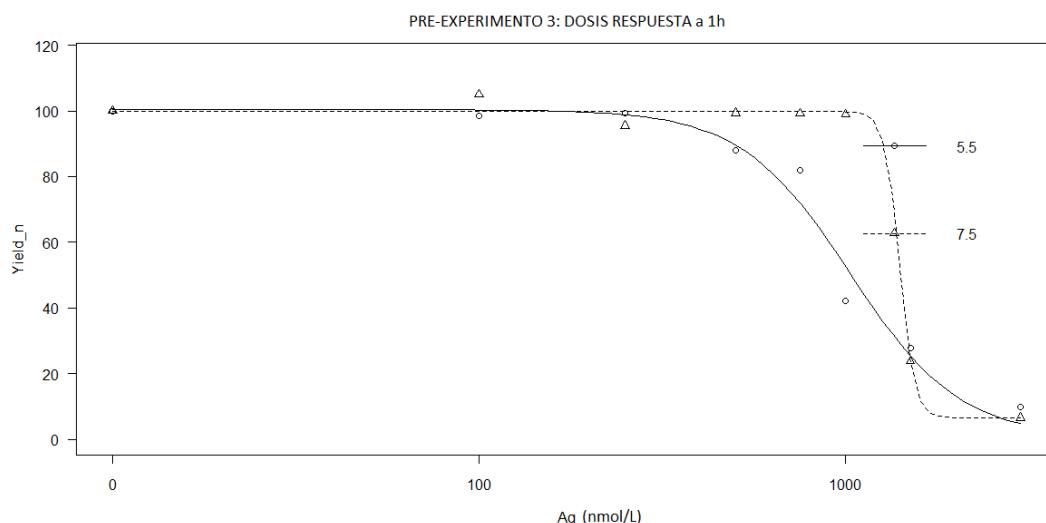
Gráfica 1. Representación de rendimientos de la fotosíntesis para diversos pH para varios tiempos

Se observa que conforme el pH es más ácido respecto a los casos control a pH 7.5 el rendimiento de la fotosíntesis se ve afectado, aunque en un rango pequeño. También se observa que a los pH de 5.5 y 6, los tiempos de exposición de las algas en el medio tienen influencia, registrado las caídas del porcentaje de yield más grandes respecto al resto de muestras, con valores en torno al 88%.

Pre-experimento 3: dosis-respuesta a varios pH

El objetivo era la comparación de los rendimientos de algas en contacto con plata en función de diferentes pH a una y a dos horas de exposición. La figura 3 muestra las curvas correspondientes a cada tiempo de exposición, permitiendo la comparación directa de los valores de yield entre los dos valores de pH.

Se observa un comportamiento similar entre las curvas a mismo pH en los dos tiempos de exposición, sin embargo sí que hay diferencias entre la tendencia de los rendimientos entre el pH 5.5 y el de 7.5.



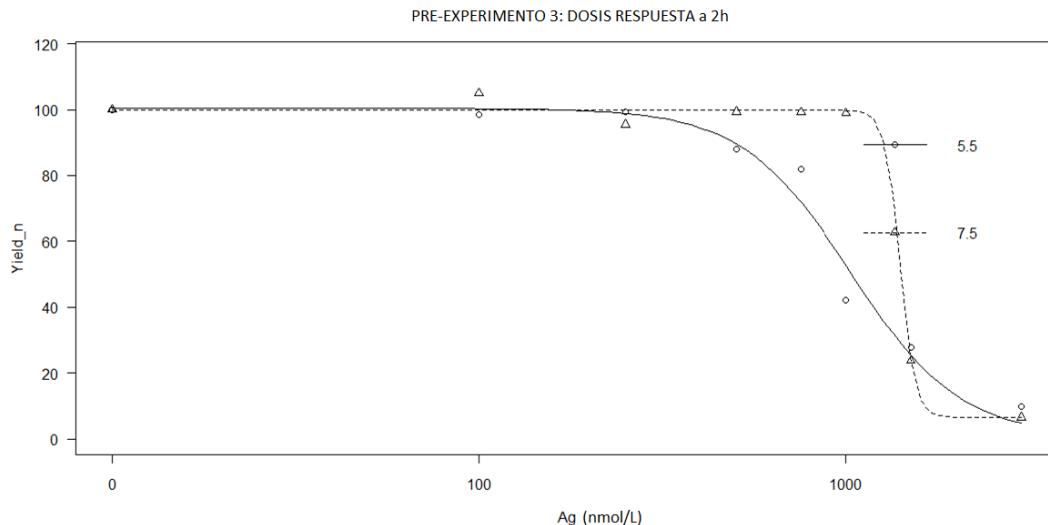


Figura 3. Curvas dosis-respuesta a distintos pH representadas a 1h y 2h

Estas diferencias se pueden comprobar en los valores de las EC_{50} para cada curva, mostrados en la tabla 2, con sus correspondientes errores estándar.

pH	Valores EC_{50} (nM)	
	1h	2h
7.5	1401.3	1100.5 ± 83.0
5.5	1028.1 ± 135.5	1013.2 ± 34.2

Tabla 2. Valores de EC_{50} para cada curva dosis-respuesta en función del pH y el tiempo de exposición

A 1 hora de exposición hay una mayor diferencia entre los valores que a 2 horas. Siendo las diferencias analizadas mediante los p-valores, se observan unos resultados de 0.108 y 0.302 para una y dos horas, respectivamente. Pese a verse variaciones, no son significativas. En ambos casos la caída del rendimiento se produce antes a pH más ácido, siendo las tendencias muy similares tanto a 1 como a 2 horas.

Cabe destacar que el propio programa no permitió el cálculo del error estándar para el dato de EC_{50} del pH 7.5 a una hora, puesto que no hay suficientes datos de puntos intermedios. De datos para una concentración de 1000 nM se pasa a 1500 y posteriormente a 3000 nM, estando lo suficiente espaciados como para dar problemas al programa en el cálculo de errores. Por ello, una de las conclusiones ha de ser que en posteriores experimentos se aumente el número de puntos de análisis entre estos rangos de interés para aumentar el grado de precisión en el cálculo de errores.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

5.1 Curva dosis-respuesta

Todos los datos de rendimiento en la fotosíntesis de las algas de las rectas de calibración obtenidos durante los distintos ensayos experimentales de ecotoxicidad han sido integrados en una única y definitiva curva dosis-respuesta, reflejando las interacciones de la plata procedentes de nitrato de plata con las algas a distintos tiempos de exposición.

Para el ajuste de las curvas de dosis-respuestas presentada en la figura 4, se utilizaron los valores de concentración reales (medidos por ICP-MS) en sustitución de los nominales.

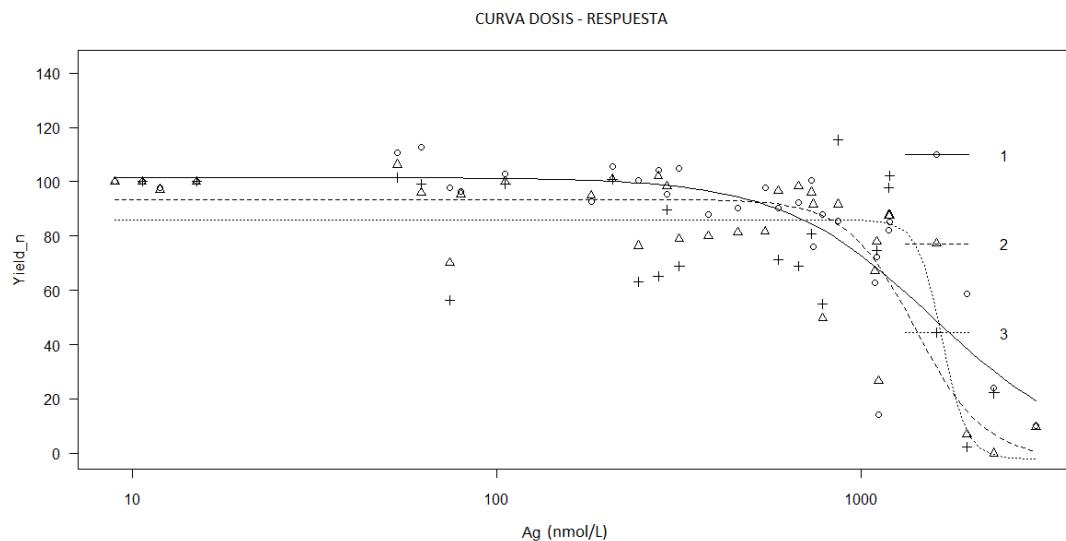


Figura 4. Curva dosis-respuesta con todos los datos experimentales con AgNO_3

En dicha figura se observan las tendencias de los rendimientos conforme a la cantidad de plata expresada en molaridad. Un incremento de las concentraciones de nitrato de plata produce una reducción de la fotosíntesis de las algas, sin importar los tiempos de exposición en los que se trabaje. A una hora la reducción se muestra con una bajada de los porcentajes de yield más suave que a tiempos posteriores, siendo el caso de la tercera hora donde se produce más bruscamente. Los datos de las EC_{50} para cada caso aportan más información sobre estas observaciones, véase la tabla 3.

	EC_{50} (nM)	Std. Error
1h	1570.4	567.6
2h	1416.0	114.5
3h	1674.1	42.0

Tabla 3. Datos EC_{50} para diferentes tiempos de exposición con su correspondiente error estándar

Comparando los valores de las EC_{50} , la toxicidad parece disminuir ligeramente en función del tiempo (mayores valores de EC_{50}). Pese a todo, las comparaciones estadísticas indican que no hay diferencias significativas en la toxicidad del nitrato de plata de 1 a 2 horas de exposición (ver tabla 4), que será el marco temporal en el cual se realizarán el resto de los experimentos.

COMPARACIÓN EC_{50}				
Parámetros comparados	Estimación	Std. Error	t-value	p-value
1h/2h	1.11	0.41	0.26	0.791
1h/3h	0.94	0.34	-0.18	0.855
2h/3h	0.84	0.07	-2.15	0.032

Tabla 4. Comparación datos EC_{50} entre diferentes tiempos de exposición

5.2 Resultados de soluciones con AgNP

5.2.1 Cantidad de plata liberada por superficie

Los resultados de las concentraciones de plata medidas en ICP-MS presentes en las soluciones problema se muestra en la tabla 5, clasificándolos en función de su pH, el tratamiento de la muestra con microondas, los volúmenes de liberación de plata y la superficie de plástico de la que proceden.

	Muestra	pH	Sup plástico (cm ²)	Vol liberación (ml)	Ratio sup/vol (cm ² /ml)	M ICP-MS (nM)	Cantidad Ag/superficie (nmol/cm ²)
Exp 1	NP MW ^a	5.5	9.92	8	1.24	12.64	10.19
	NP	5.5	9.92	8	1.24	36.15	29.15
	NP MW	7.5	9.92	8	1.24	< LQ	< LQ
	NP	7.5	9.92	8	1.24	17.21	13.88
Exp 2	NP MW	5.5	13.05	8	1.63	< LQ	< LQ
Exp 3	NP	5.5	13.05	8	1.63	15.41	9.45
	NP	5.5	28.35	8	3.54	< LQ	< LQ
Exp 4	NP MW	5.5	28.35	8	3.54	< LQ	< LQ
	NP MW	5.5	43.65	9	4.85	< LQ	< LQ
	NP MW	5.5	58.95	8	7.37	< LQ	< LQ
Exp 5	NP	5.5	140	40	3.50	12.08	3.45
	NP MW	5.5	140	40	3.50	21.84	6.24
	NP MW	5.5	140	40	3.50	21.45	6.13
Exp 6	NP	5.5	79.24	8	9.90	13.59	1.37
	NP MW	5.5	79.24	8	9.90	16.62	1.68
Exp 7	NP	5.5	90.64	8	11.33	18.58	1.64
	NP MW	5.5	90.64	8	11.33	197.97	17.47

^a MW: calentamiento con microondas

Tabla 5. Resultados de cantidades de plata liberada por superficie de plástico en los experimentos realizados, medidos mediante ICP-MS

Los resultados se muestran finalmente normalizados en función de la superficie desde la que han sido liberadas las cantidades de plata, pertenecientes a los envases de plástico Kinetic Go Green. El cálculo de este ratio permite las comparaciones directas entre los resultados de las muestras de todos los experimentos, de forma que se puede estudiar la influencia de factores como el pH del medio o el calentamiento con microondas en la liberación de la plata en el medio de estudio.

Ciertos resultados de la cantidad de plata expresados en nanomolaridad están por debajo del límite de cuantificación (LQ) determinado por la propia técnica analítica. Este valor es calculado a partir de los datos de las señales obtenidas para el blanco de calibración (en cuentas por segundo), calculando su promedio y su desviación estándar (976.74 ± 28.58). Se calcula multiplicando el valor de la desviación estándar por diez y dividiéndolo por la pendiente de la recta de calibrado obtenida. Es por ello que para las muestras en las que la señal obtenida durante su medición en el espectrómetro de masas es menor de este valor, no se puede determinar ninguna concentración concreta, considerándose para cálculos posteriores como si no tuviera ninguna cantidad relevante de plata en la muestra.

Influencia del pH en la liberación de plata

El conjunto de los resultados de plata nanoparticulada liberada a lo largo de todos los ensayos realizados en función del pH se muestra en la siguiente tabla:

pH	Cantidad Ag/superficie (nmol/cm ²)
5,5	1,4
5,5	1,6
5,5	1,7
5,5	3,5
5,5	6,1
5,5	6,2
5,5	9,4
5,5	10,2
5,5	17,5
5,5	29,2
7,5	13,9

Tabla 6. Resumen datos de plata liberada (AgNP) en función del pH

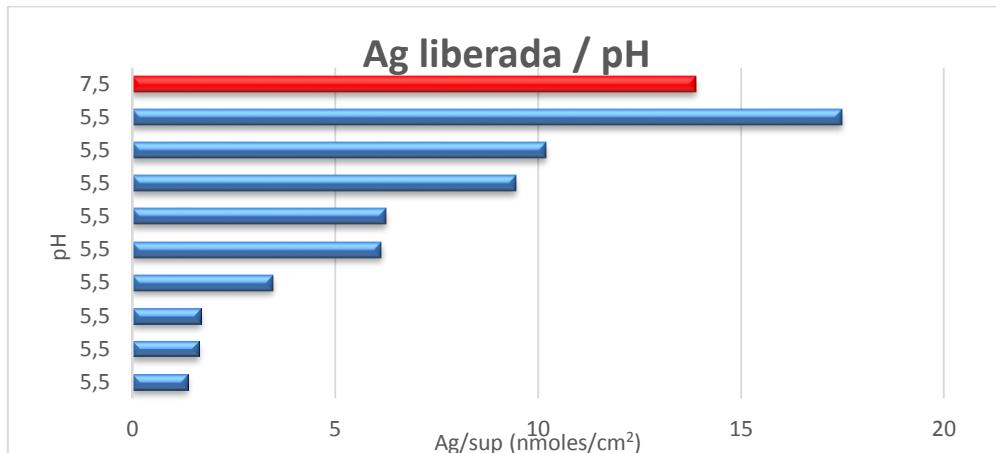
Solo se muestran los resultados para los cuales se ha podido cuantificar la cantidad de plata por superficie de liberación, obviando los que están por debajo del límite de cuantificación.

El dato correspondiente a una liberación de 29.2 nmol/cm² es descartado para próximos cálculos, puesto que se considera como un *outlier*. La tabla con las condiciones calculadas estadísticamente para la consideración de estos datos atípicos determina la desestimación de este valor al estar por encima del límite superior.

Cuartil 1	Cuartil 2	Cuartil 3	Límite inferior	Límite superior
2.1	6.2	10.0	-9.7	21.8

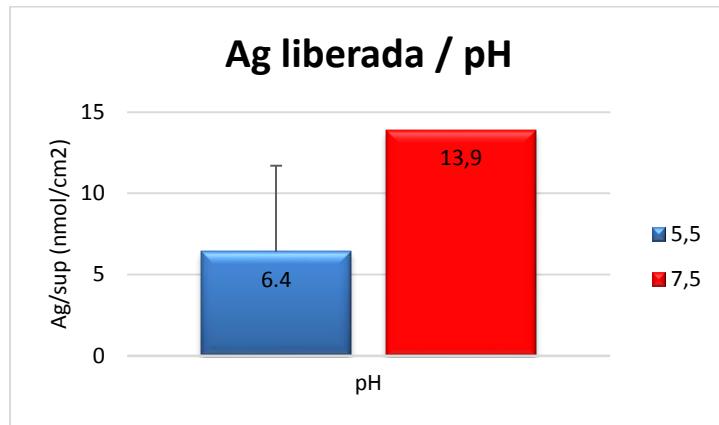
Tabla 7. Condiciones para la determinación de *outliers* para datos a pH 5.5

Si se comparan los resultados para todos los experimentos en conjunto se observa que la cantidad de plata liberada por unidad de superficie a pH 7.5 muestra un valor muy por encima de la mayoría de los obtenidos a pH 5.5, siendo solo superado por una de las muestras de estudio con un ratio de 17.5 nmol/cm².



Gráfica 2. Resultados de cantidades de plata liberadas por superficie en función del pH

Esta observación se corrobora en la gráfica 3, donde se muestran los valores promedio de las liberaciones de plata para cada pH. Para pH 5.5, el promedio final es de 6.4 ± 5.3 , mientras que para el caso de pH 7.7 el promedio es de 13.8 nmol/cm^2 , sin presentar desviación estándar puesto que es un único dato. Se comprueba que en principio la liberación de plata esta favorecida a pH neutro.



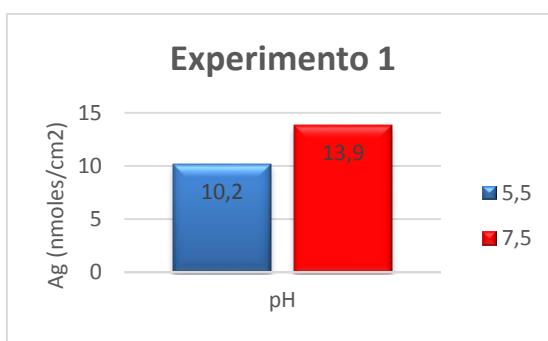
Gráfica 3. Representación de los promedios de plata liberada por cada pH

Para comprobar si estas diferencias son significativas de que el pH influye en la liberación de plata se realiza un análisis de la varianza, ANOVA, en función de este conjunto de datos. Los datos se diferencian en dos grupos en función del pH.

pH	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm ²)	Media (nmol/cm ²)	Desv. Est. (nmol/cm ²)	P-valor
5.5	9	57.6	6.4	28.2	0.218
7.5	1	13.9	13.9	-	

Tabla 8. Resumen parámetros test ANOVA para muestras en función del pH

Si la comparación se realiza por cada experimento realizado, solo se obtiene el caso del experimento 1, puesto que en los demás se trabajó a pH 5.5.



Gráfica 4. Liberación de plata por unidad de superficie en experimento 1 a distintos pH

En la gráfica 4 se muestran estos resultados, siguiendo la tendencia que en la comparativa con el resto de experimentos se mostraba. En este caso las diferencias son más pequeñas, un ratio de 10.2 frente a 13.8 nmol/cm^2 , por lo que sabiendo que teóricamente en un medio más ácido se va a favorecer la liberación de la plata en formas iónicas se escoge esta condición de pH como constante de trabajo para experimentaciones posteriores.

Influencia del calentamiento con microondas en la liberación de plata

El conjunto de datos experimentales utilizados para el estudio de la influencia del calentamiento con microondas en la liberación de plata se muestra en la tabla 9, clasificándose en dos grupos de cinco muestras para cada caso, uno con uso de microondas (MW) y otro sin calentamiento.

Características	Cantidad Ag/superficie (nmol/cm2)
Sin MW	1,4
Sin MW	1,6
Sin MW	3,5
Sin MW	9,4
Sin MW	29,2
Con MW	1,7
Con MW	6,1
Con MW	6,2
Con MW	10,2
Con MW	17,5

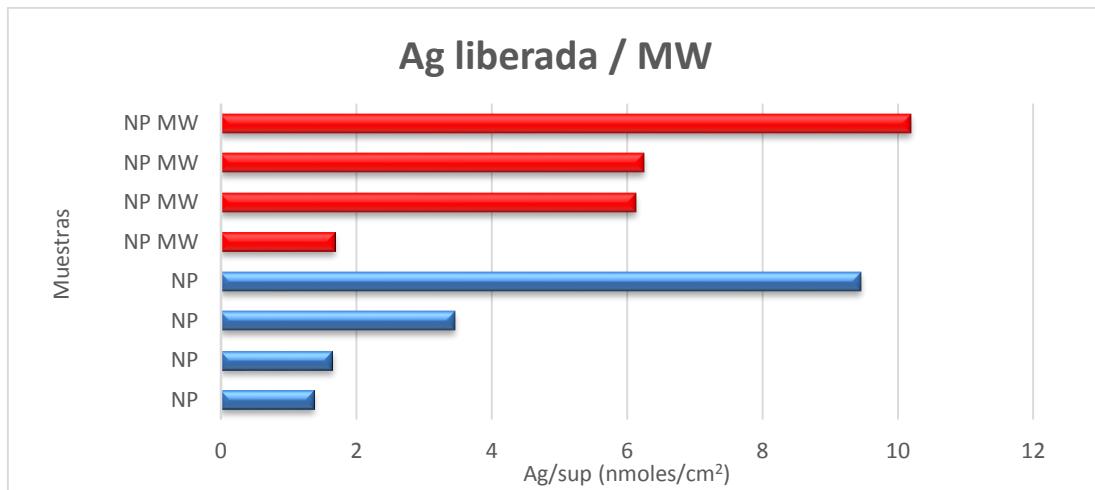
Tabla 9. Conjunto de datos experimentales clasificados en uso con microondas

Los datos se muestran ordenados en función del ratio de cantidad de plata por superficie de liberación. Dos de ellos se muestran en rojo puesto que son los considerados *outliers*, de acuerdo con los criterios descritos en el tratamiento estadístico, siendo en ambos casos superiores a los límites establecidos por el sistema de cálculo de cuartiles, cuyos resultados se muestran en la tabla 10.

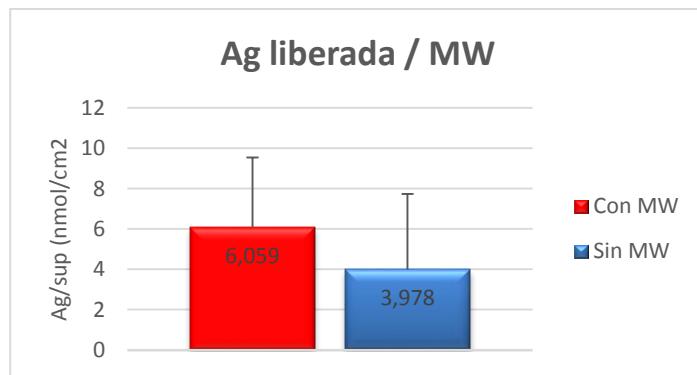
Sin MW		Con MW	
Cuartil 1	1,64	Cuartil 1	6,13
Cuartil 2	3,45	Cuartil 2	6,24
Cuartil 3	9,45	Cuartil 3	10,19
Límite inf	-10,07	Límite inf	0,03
Límite sup	21,16	Límite sup	16,29

Tabla 10. Condiciones para la determinación de *outliers* para datos con/sin microondas

Las muestras que fueron calentadas con microondas tienen en general unos valores superiores en cuanto a liberación de plata por superficie de plástico que si no fueron calentadas. Esta tendencia ya se observa en la gráfica 5, sin embargo se confirma calculando los valores promedios con sus desviaciones estándar, mostrados en la gráfica 6, con unos valores de 6.06 ± 3.48 y 3.98 ± 3.76 nmoles por cm^2 para los calentados y sin calentar, respectivamente.



Gráfica 5. Datos de cantidades de plata liberadas en función de si la muestras eran calentadas con microondas



Gráfica 6. Representación de los promedios de plata liberada en función del uso de microondas con sus desviaciones estándar

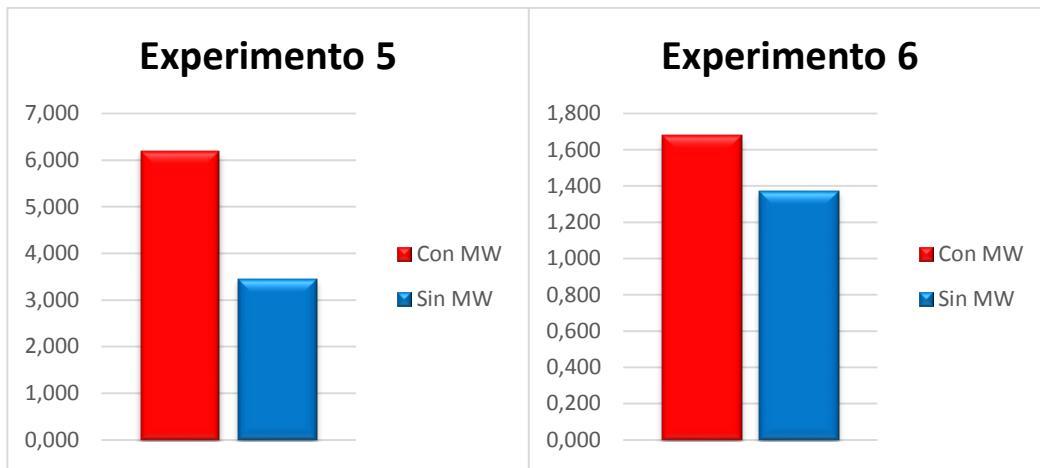
Para hacer más representativos los resultados sin influencias del pH en que se realizaron, se omitieron los casos con pH distinto de 5.5.

El estudio de la relación de los resultados distribuidos en función de si ha habido o no utilización de microondas se completa con el análisis ANOVA, cuyos resultados se muestran resumidos en la siguiente tabla. Cabe destacar que el p-valor no está por debajo del valor de 0.05.

Tratamiento	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm²)	Media (nmol/cm²)	Desv. Est. (nmol/cm²)	P-valor
Sin MW	4	15.9	4.0	14.2	
Con MW	4	24.2	6.1	12.1	0.447

Tabla 11. Resumen parámetros test ANOVA para muestras en función del pH

En la presentación de los resultados en los distintos experimentos realizados, se puede observar en la gráfica 7 el caso de los experimentos 5 y 6, que permite la comparación entre muestras preparadas bajo las mismas condiciones. En ambos se muestran unos resultados muy similares, con un ratio algo superior para el caso de las muestras que han sido calentadas con microondas tras el periodo de incubación. Los resultados no muestran las desviaciones estándar puesto que se trata de datos sin réplicas.



Gráfica 7. Comparativa cantidades de plata liberada en función de procedimiento de calentamiento, en varios experimentos.

5.2.2 Ensayos ecotoxicidad con AgNP

El conjunto de resultados obtenido durante los distintos ensayos ecotoxicológicos realizados se recogen en la tabla 12, mostrándose divididos en función del experimento del que procedan. Se especifican a su vez las condiciones de cada uno de ellos, al menos las más relevantes para la estimación final de las concentraciones de plata, expresadas en nanomolaridad, liberadas en el medio de experimentación y que ha interactuado a distintos tiempos de exposición con las algas.

	Muestra	pH	Sup plástico (cm ²)	M ICP-MS (nM)	Ag biosensores (nM)		
					1h	2h	3h
Exp 2	NP MW	5.5	13.05	9.77	229	614	1060
	NP	5.5	13.05	15.41	100	-	-
Exp 3	NP	5.5	28.35	9.65	221	-	-
	NP MW	5.5	28.35	9.83	178	-	-
Exp 4	NP MW	5.5	43.65	10.87	193	656	< LS
	NP MW	5.5	58.95	11.34	67	363	884
Exp 5	NP	5.5	140	12.08	205	164	-
	NP MW	5.5	140	21.84	119	569	-
	NP	5.5	140	225.55	96	< LS	-
	NP MW	5.5	140	21.45	93	487	-
Exp 6	NP	5.5	79.24	13.59	< LS	< LS	1290
	NP MW	5.5	79.24	16.62	107	432	1226
Exp 7	NP	5.5	90.64	18.58	< LS	802	1182
	NP MW	5.5	90.64	197.98	137	236	922

^a MW: calentamiento con microondas

Tabla 12. Resultados de ensayos ecotoxicológicos para estimación de cantidades de plata liberadas en función de tiempos de exposición con algas

Se muestran los valores de las concentraciones determinadas mediante la técnica instrumental ICP-MS, puesto que sirven como base de las estimaciones posteriores en los ensayos, utilizando como valores iniciales de plata contenidos en las soluciones con nanopartículas.

En función de los experimentos los tiempos de exposición variaron, de ahí que no todas las columnas contengan valores de concentración.

Además, para los valores que estaban por debajo de los límites de cuantificación para este tipo de metodología, se señalan como valores con el símbolo < LS, que corresponde con el límite de sensibilidad de las algas para su determinación. Este límite fue determinado mediante el cálculo del intervalo de confianza, en un nivel de confianza del 95%, de los valores de yield obtenidos para todos los casos control a lo largo de todos los experimentos realizados. Los promedios de estos valores se clasificaron para los diferentes tiempos de exposición.

La representación de los valores de los controles se puede observar en la figura 4, junto con todos los valores experimentales de las rectas de calibrado. Los valores promedio de los controles corresponden a los máximos alcanzados en las rectas representadas, que junto con sus desviaciones típicas son parámetros calculados por el propio programa con el que se realizan las curvas dosis-respuesta, R (R Foundation for Statistical Computing, 2011), presentados en la tabla 13.

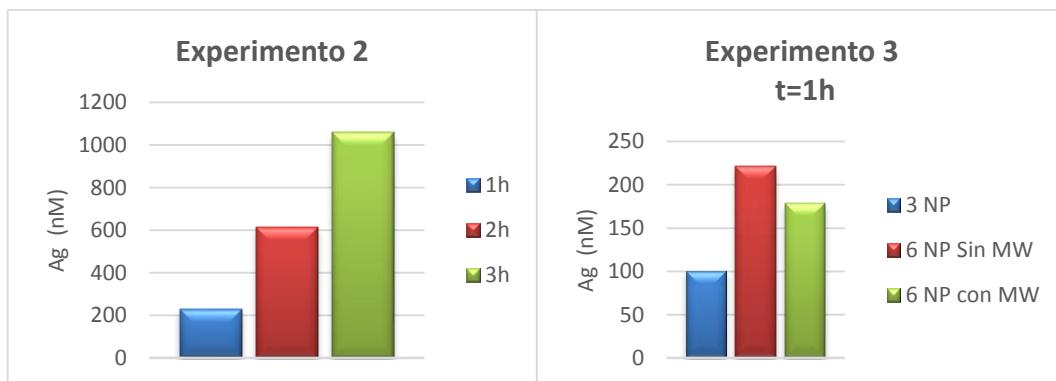
Tiempo exposición	Yield controles (%)	Desviación estándar (%)	Cuasidesviación	Margen de error (%)	Valor intervalo inferior (%)	Ag (nmol)
1h	101.5	2.6	2.64	± 1.13	100.39	11.69
2h	93.4	2.3	2.35	± 1.00	92.44	144.06
3h	85.8	2.3	2.36	± 1.29	84.55	778.62

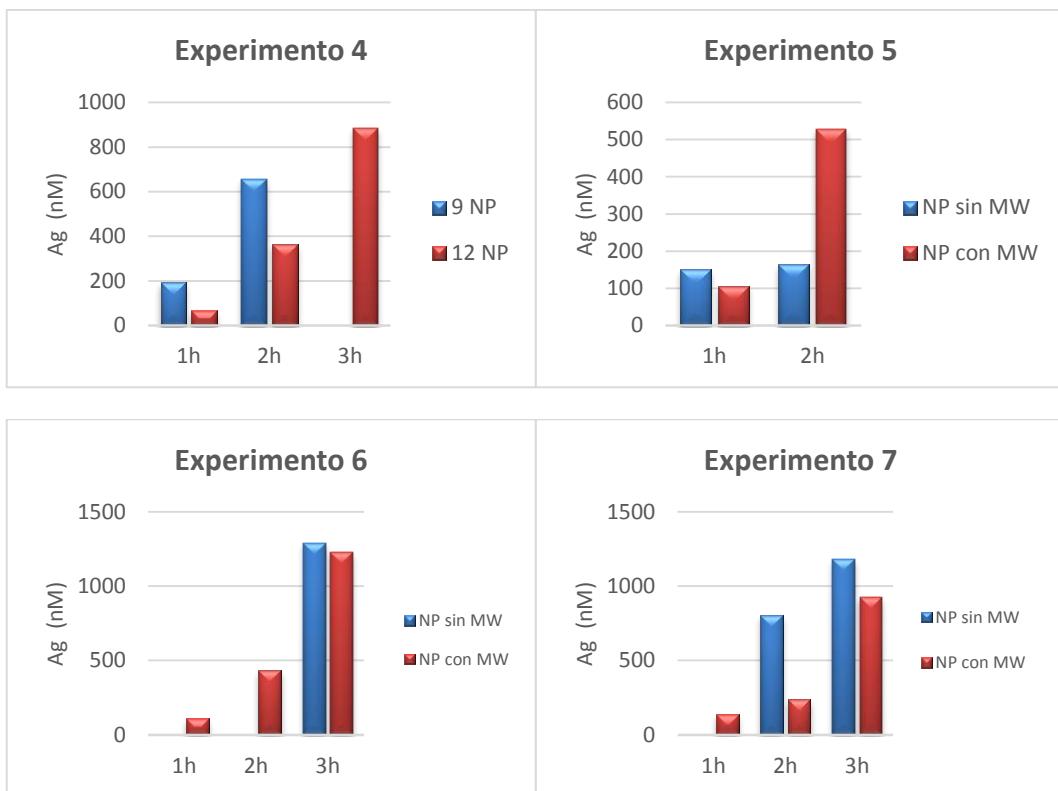
Tabla 13. Determinación del límite de sensibilidad para los ensayos de ecotoxicidad con algas como biosensores

Los valores utilizados como límite de sensibilidad de las algas corresponden a los valores calculados como del intervalo inferior dentro del rango de confianza estimado. A partir de ellos se calculan las concentraciones a las cuales corresponden esos rendimientos (última columna).

Estas cantidades marcan el límite que permite la cuantificación de un efecto producido exclusivamente por la plata, sin que otros factores como la propia variabilidad de las propiedades biológicas de las algas supongan una interferencia en los resultados.

Los resultados de los experimentos representados gráficamente se muestran en su totalidad en la gráfica 8, mostrando las concentraciones de plata estimadas en función de diversos factores como los tiempos de exposición, el número de fragmentos desde lo que se ha liberado, el pH o el tratamiento con microondas de las muestras previo a los ensayos.





Gráfica 8. Conjunto de representaciones de los diferentes experimentos realizados en ensayos ecotoxicológicos

En todos los experimentos donde se han realizado medidas en función de varios tiempos de exposición de las algas con la plata se observan que sus valores van en un constante aumento, siendo siempre a la tercera hora donde se registran los máximos valores.

En el caso del experimento 2, los crecimientos de los valores estimados crecen en la segunda hora un 168% respecto a la primera hora, y finalmente un 73% más a la tercera hora. Similar comportamiento se observa en el experimento 4, donde se estudia para diferentes cantidades de plástico desde la que se libera la plata, donde para el caso de 9 fragmentos solo se produce un aumento del 240% de la primera a la segunda hora, aunque sin embargo a la tercera hora no se detecta presencia alguna de plata. Para la muestra con 12 fragmentos sí que se produce un aumento continuo hasta la tercera hora, con valores de 441 y 143% de incremento a dos y tres horas respectivamente, respecto a la hora anterior.

Otros experimentos, como los casos 3, 5, 6 y 7, permiten comparar los valores de liberación en función de si han sido calentadas con microondas. En el experimento 3, aunque sólo se tengan datos a una hora de exposición, se observa que la plata liberada para la comparativa de calentamiento con microondas o sin microondas muestra resultados similares, incluso un poco mayor en el caso de la muestra en la que no se ha utilizado microondas, con un 24% más que en el otro caso. El resto de experimentos permite además observar su evolución temporal, mostrando que los que han sido calentados con microondas el aumento de la concentración de plata que interactúa con las algas tiene un crecimiento más regular que para los que no fueron calentados. Las irregularidades mostradas al no utilizar microondas se manifiestan de diversas maneras, en el experimento 5 sin producirse variaciones temporales en las cantidades de plata y en el experimento 6 y 7 con interacciones tardías con las algas.

Pese a todo a las terceras horas de exposición con algas, se estiman unas cantidades similares de plata para ambos casos, en los experimentos 6 y 7, con unas cantidades en torno a los 1250 y 1000 nM, respectivamente.

Los análisis de las relaciones de las variables temporales en la exposición o la utilización de microondas para el calentamiento de muestras para ver cómo afectan a la liberación de plata se realizan empleando el método ANOVA. Se han distinguido, por tanto, dos tipos de análisis, uno para cada variable estudiada; mostrándose los resultados en diferentes tablas. Los datos a partir de los cuales se ha realizado se muestran en la tabla resumen 14.

Resultados experimentales (nM)			
Tratamiento	1h	2h	3h
NP	100	164	1290
	221	802	1182
	205		
	96		
NP MW	229	614	1060
	178	656	884
	193	363	1226
	67	569	922
	119	487	
	93	432	
	107	236	
	137		

Tabla 14. Tabla resumen con los datos experimentales de los ensayos ecotoxicológicos a 1, 2 y 3 horas utilizados en la comparativa estadística

- Liberación de plata en función del tiempo:

Primero se realiza el análisis con todos los datos de la tabla 12 divididos en función del tiempo de exposición, sin distinguir entre si fueron calentados o no con microondas.

Tiempo exposición	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm ²)	Media (nmol/cm ²)	Desv. Est. (nmol/cm ²)	P-valor
1h	12	1749,2	145,8	3202,6	$1.3 \cdot 10^{-11}$
2h	9	4327,9	480,9	41978,4	
3h	6	6567,1	1094,5	27629,7	

Tabla 15. Resumen test ANOVA para muestras en función del tiempo de exposición (datos brutos)

Una vez se comprueba que hay diferencias significativas, se especifican en mayor grado los posibles casos de relación, diferenciando también entre los que han utilizado o no microondas.

Tiempo exposición	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm ²)	Media (nmol/cm ²)	Desv. Est. (nmol/cm ²)	P-valor
1h	4	623,5	155,9	4421,1	0.005
2h	2	967,1	483,5	203241,5	
3h	2	2472,7	1236,3	5878,5	

Tabla 16. Resumen test ANOVA para muestras en función del tiempo de exposición sin microondas

Tiempo exposición	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm ²)	Media (nmol/cm ²)	Desv. Est. (nmol/cm ²)	P-valor
1h	8	1125,7	140,7	3050,4	$8.25 \cdot 10^{-9}$
2h	7	3360,9	480,1	22094,7	
3h	4	4094,4	1023,6	23974,0	

Tabla 17. Resumen test ANOVA para muestras en función del tiempo de exposición con microondas

- Liberación de plata en función del uso de calentamiento con microondas:

En este caso los datos han sido distribuidos por si ha habido o no calentamiento de las muestras, pero diferenciando tres tipos de situaciones: los tiempos de exposición. De este modo se muestran los resultados del análisis ANOVA en las siguientes tablas.

Tratamiento	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm ²)	Media (nmol/cm ²)	Desv. Est. (nmol/cm ²)	P-valor
Sin MW	4	623,5	155,9	4421,0	0.682
Con MW	8	1125,7	140,7	3050,4	

Tabla 18. Resumen test ANOVA para muestras en función del calentamiento con microondas a 1h

Tratamiento	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm ²)	Media (nmol/cm ²)	Desv. Est. (nmol/cm ²)	P-valor
Sin MW	2	967,1	483,5	203241,5	0.985
Con MW	7	3360,9	480,1	22094,6	

Tabla 19. Resumen test ANOVA para muestras en función del calentamiento con microondas a 2h

Tratamiento	Nº muestras	Sumatorio (nmol/cm ²)	Media (nmol/cm ²)	Desv. Est. (nmol/cm ²)	P-valor
Sin MW	2	2472,7	1236,3	5878,5	0.153
Con MW	4	4094,4	1023,6	23974,0	

Tabla 20. Resumen test ANOVA para muestras en función del calentamiento con microondas a 3h

6. DISCUSIÓN

Los pre-experimentos realizados sirvieron para ajustar los protocolos de trabajo. Así, por ejemplo, como se sabe que entre 1 y 2 horas no debe haber cambios en la toxicidad del nitrato de plata, las diferencias significativas obtenidas (figura 2) se debieron a la falta de experiencia en el trabajo; obteniéndose más tarde resultados coherentes. Por otro lado, en el estudio de la influencia del pH sobre la fotosíntesis, aunque se mide una cierta afectación de la capacidad de fotosíntesis a los pH más bajos, las diferencias a los tiempos de exposición habituales no son significativas. Todo ello permitió ajustar y diseñar los experimentos que a continuación se discuten.

De acuerdo a los experimentos realizados, lo primero que se demuestra es el efecto tóxico que en los rendimientos de la actividad de fotosíntesis en las algas provoca la plata presente en el medio (figura 4). Las diferencias en función del tiempo no son significativas en el marco temporal utilizado en los experimentos posteriores (tabla 4). La significativa menor toxicidad a 3 horas (respecto a 1 y 2), puede deberse a que tras ese tiempo, las algas hayan podido activar mecanismos de detoxificación para contrarrestar el efecto de la plata sobre la fotosíntesis.

Además, gracias a la técnica analítica de ICP-MS se comprueba también que se produce una liberación de plata desde los fragmentos de plástico procedentes de los recipientes de conservación de comida Kinetic Go Green (tabla 5) tras dejar en incubación en medio MOPS durante dos semanas en agitación continua. Con los resultados experimentales no se puede establecer una proporcionalidad específica entre la superficie de exposición del plástico en el medio con la liberación de plata producida (ratio cantidad de plata/superficie plástico).

En cuanto a los mecanismos de la liberación de plata, se parte sabiendo que a pH más ácidos se fomenta la formación de plata iónica (Ag^+) a partir de las nanopartículas (He, Dorantes-Aranda y Waite, 2012; Xiu et al, 2012) liberadas en el medio. Sin embargo, en los experimentos realizados no se producen unos resultados que muestren diferencias significativas entre los ratios de liberación en medios ácidos a pH 5.5 o a 7.5. Pese a que en la comparativa de los resultados se relacionen un solo dato disponible a pH neutro frente a nueve a pH más ácido (tabla 8), este mismo comportamiento se observa comparando los valores obtenidos en la realización del experimento 1 (gráfica 4), mostrando unos valores de migración similares en ambos casos, si bien algo mayores en el medio neutro.

Por otro lado, se demuestra que la utilización de microondas favorece la liberación de plata (gráficas 5 y 6) en función de los datos promedio a lo largo de todos los experimentos. Esto también se corrobora con la comparativa experimento a experimento, donde en los experimentos 5 y 6 se muestran unas concentraciones de plata mayores en los casos del calentamiento en microondas tras incubación (gráfica 7). Sin embargo, estas diferencias son muy pequeñas y no significativas conforme a los test ANOVA realizados (tabla 11). Quizás, la superficie empleada (limitada a los trozos que pudieron hacerse a partir de un número limitado de recipientes) no fue suficiente para liberar la plata suficiente para que las determinaciones analíticas permitieran establecer conclusiones sólidas.

En los ensayos toxicológicos se demostró la toxicidad que desde la liberación de las nanopartículas de plata se produce en las algas, a modo de reducciones en los rendimientos de su capacidad de fotosíntesis. Pese a que como se pudo comprobar en los pre-experimentos las variaciones en las concentraciones de nitrato de plata que producen unos efectos en el tiempo sobre las algas no varían de forma relevante, sí que se observan grandes variaciones en función del tiempo de exposición con la presencia de nanopartículas de plata. Esto sugiere una relación de dependencia con el tiempo de exposición para la explicación de las interacciones que sufren con las algas. La plata liberada desde los envases no está toda en forma iónica, lo que indicaría que se liberan también nanopartículas de plata (que necesitarían de un tiempo para disolverse y afectar a la fotosíntesis algal), o que hay otros compuestos plásticos que actúan como ligandos de la plata, retrasando en el tiempo la absorción de la plata por parte de las algas.

Para la primera hora de exposición en la mayoría de los casos suponen los valores de estimación de plata más bajos (tabla 12), debidos a los grandes porcentajes de rendimiento que todavía se mostraban en las algas; mostrándose un aumento considerable de estas estimaciones con el paso del tiempo, con valores de incremento de 168% y 362% a dos y tres horas, respectivamente, en el experimento 2 (gráfica 8).

Así, en la primera hora de exposición de las algas con las nanopartículas no hay gran cantidad de estos iones, sino que la plata está principalmente en forma de nanopartícula. Las condiciones ácidas y aeróbicas del entorno por presencia de las algas suponen la oxidación hacia formas iónicas, que sí resultan tóxicas para la fotosíntesis algal. Este proceso no es inmediato, y es por ello que los efectos de las reducciones en los rendimientos comienzan a verse más tarde, a dos y tres horas, mostrándose con unas caídas en las gráficas de dosis respuesta mucho más bruscas a partir de dos horas (figura 3). Estas diferencias se muestran significativamente (gráficas 15, 16 y 17), en los test ANOVA realizados para las estimaciones realizadas durante los ensayos ecotoxicológicos, donde se observan estos incrementos en los valores conforme aumenta el tiempo de exposición.

Del estudio del uso de microondas como factor de liberación de plata se observa que para los casos en que ha sido calentado se produce un comportamiento que se repite en todos los experimentos, el aumento regular de las concentraciones estimadas con el paso del tiempo de exposición (gráfica 8). Ya desde la primera hora de exposición se libera algo de plata en forma iónica, producto de la formación de Ag^+ a partir de AgNP, y continúa incrementándose. Este patrón de comportamiento no se observa en las que no se calentaron, observándose variedades como que no se produce liberación hasta la segunda o tercera hora de exposición, que se libera toda de una sola vez o que su concentración no varía temporalmente. Con ello se concluye que el calentamiento en microondas favorece la formación de iones de plata a partir de las nanopartículas liberadas en el medio, de ahí que se detecte interacción desde el primer momento y que su concentración aumenta con el tiempo de interacción con las algas.

En cuanto a las variaciones en la plata liberada en función de si han sido o no calentadas, sin tener en cuenta la variable temporal, no se muestran diferencias significativas entre ambos conjuntos de resultados (tablas 15, 16 y 17).

En cuanto a la relevancia práctica de estos resultados, se pueden mostrar en unos cálculos; el promedio de liberación de plata por superficie es de 6 nMolar/cm². Considerando la superficie total comprendida por un envase de Kinetic Go Green (tan sólo las caras internas), se estima que la plata exponencial liberada puede ser de 2500 nM, dato que supone el 66% del límite máximo recomendado para el consumo humano diario en un adulto de 80 kg, que es de 3700 nM (valor establecido por la EPA).

7. CONCLUSIONES

1. A lo largo de este estudio se demuestra que se produce una liberación de plata desde los fragmentos de plástico procedentes de los envases de conservación de comida *Kinetic Go Green*. La limitación de materiales para realizar más experimentos no ha permitido establecer una relación entre la cantidad de plata liberada y la superficie utilizada.
2. Resultados anteriores, demuestran que las condiciones ácidas favorecen la oxidación de plata iónica a partir de las nanopartículas. En nuestro caso, la reducción del pH de 7.5 a pH 5.5, no ha resultado un incremento significativo del proceso de liberación de plata.

3. La temperatura parece fomentar (incremento no significativo) la liberación de plata desde el plástico hacia el medio líquido. Serían necesarios más experimentos (igual que lo explicado en la conclusión 1).

4. Los resultados de ecotoxicología sirvieron para demostrar que la plata liberada en el medio reduce la capacidad fotosintética de las algas. Conforme pasa el tiempo (1, 2 y 3 horas), la cantidad de plata “detectada” por las algas incrementa notablemente (ver tabla 14). Ello sugiere que la plata liberada, no está biodisponible inicialmente para las algas (como Ag^+); y que es solo a través de diferentes procesos (dependientes del tiempo, como la oxidación o la competencia entre algas y ligandos) que se incrementa la cantidad e incorporación de Ag^+ por parte de las algas.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adams, L. K., Lyon, D. Y., & Alvarez, P. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO_2 , SiO_2 , and ZnO water suspensions. *WATER RESEARCH*, 40, 3527-3532.

Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klüttgen, B., & Christensen, F. M. (2011). Analysis of Currently Available Data for Characterising the Risk of Engineered Nanomaterials to the Environment and Human Health-lessons Learned from Four Case Studies. *ENVIRONMENT INTERNATIONAL*, 37, 1143-1156.

Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M. R., & Bottero, J. (2009). Chemical stability of Metallic Nanoparticles: A Parameter Controlling Their Potential Cellular Toxicity in Vitro. *ENVIRONMETAL POLLUTION*, 157, 1127-1133.

Behra, R., Sigg, L., Clift, M. J., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., & Rothen-Rutishauser, B. (2013). Bioavailability of Silver Nanoparticles and Ions: from a Chemical and Biochemical Perspective. *THE ROYAL SOCIETY*, 87, 1-15.

Echegoyen, Y., & Nerín, C. (2013). Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 62, 16-22.

Eckelman, M. J., & Graedel, T. E. (2007). Silver Emissions and their Environmental Impacts: A Multilevel Assessment . *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 41, 6283-6289.

He, D., Dorantes-Aranda, J. J., & Waite, T. D. (2012). Silver Nanoparticle-Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 46, 8731-9738.

Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., & Behra, R. (2008a). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 42, 8959-8964.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., & Santschi, P. H. (2008b). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *ECOTOXICOLOGY*, 17, 372-386.

- Osborne, O. J., Johnston, B. D., Moger, J., Balousha, M., Lead, J. R., Kudoh, T., & Tyler, C. R. (2013). Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *NANOTOXICOLOGY*, 7, 1315-1324.
- Piccapietra, F. (2012). Colloidal Stability of Silver Nanoparticles and their Interactions with the Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. ETH Zurich No. 20365
- R Foundation for Statistical Computing. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Development Core Team.
- Wiesner, M. R., Lowry, G. V., Dionysiou, D., & Biswas, P. (2006). Assessing the risk of manufactured nanomaterials. *ENVIRONMETAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 40, 4336-4345.
- Xiu, Z.-m., Zhang, Q.-b., Puppala, H. L., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. (2012). Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *NANO LETTERS*, 12, 4271-4275.