



Plan de Gestión de Datos

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO	
1. – Datos del Proyecto	
- Título del Proyecto (en castellano)	
<i>Nanoecotoxicología: efectos de nanopartículas de plata (NPsAg) sobre organismos acuáticos. 50620190100028LI</i>	
- Título del Proyecto (en inglés)	
<i>Nanoecotoxicology: effects of silver nanoparticles (AgNPs) on aquatic organisms. 50620190100028LI</i>	
- Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen	
<p>La incorporación de nanopartículas (NPs) a los ecosistemas no es un fenómeno reciente, aunque sí lo es la posibilidad de cuantificarlos y de medir sus efectos sobre la biota. Entender los efectos letales y subletales de contaminantes emergentes del orden nanométrico y las respuestas a estos estresores de origen antrópico es fundamental para comprender el funcionamiento integral de los ecosistemas acuáticos continentales, prever cambios a futuro y proponer medidas de manejo y conservación. En el presente proyecto se propone estudiar el efecto de nanopartículas de plata (NPsAg) sobre componentes clave de la diversidad biológica de los sistemas acuáticos del río Paraná. Esta propuesta se focalizará en organismos de distinta complejidad, niveles de organización biológica y hábitos tróficos: organismos productores uni y pluricelulares (microalgas planctónicas y macrófitas), consumidores primarios (microcrustáceos planctónicos) y depredadores tope (peces), a fin de obtener una visión integral de la problemática planteada. Se realizarán ensayos agudos y crónicos que permitirán evaluar y comparar efectos letales y subletales de NPsAg en los modelos biológicos seleccionados. Se medirán biomarcadores enzimáticos de estrés y se analizarán depósitos de NPsAg en microalgas, microcrustáceos y peces, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Adicionalmente, se desarrollarán experimentos para analizar el potencial de bioconcentración, bioacumulación y transferencia trófica entre algunas de las especies de prueba. Con la información obtenida, se espera poder contribuir a un área del conocimiento escasamente desarrollada a nivel global y de incipiente abordaje en nuestro país, la <i>Nanoecotoxicología</i>. Finalmente, se espera proponer protocolos de efecto para la evaluación de riesgo ecológico, utilizando especies de diversa complejidad estructural y funcional, representativas de los sistemas acuáticos regionales y compararlos con estándares internacionales. Se destaca la relevancia de unir dos líneas de investigación hasta el momento poco desarrolladas en la Argentina: la <i>Ecotoxicología</i> y la <i>Nanotecnología</i>.</p>	
- Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen	
<p>The incorporation of nanoparticles (NPs) into ecosystems is not a recent phenomenon, but the possibility of quantifying them and measuring their effects on biota, is. Understanding lethal and sublethal effects of emerging pollutants of the nanometric</p>	



order and the responses to these stressors of anthropic origin is essential to understand the integral functioning of continental aquatic ecosystems, foresee future changes, and to propose management and conservation measures. This project aims to study the effects of silver nanoparticles (AgNPs) on key components of the biological diversity of the aquatic biodiversity of the Paraná river. This proposal will focus on organisms of different complexity, levels of biological organization and trophic habits: single and multicellular producing organisms (planktonic microalgae and macrophytes), primary consumers (planktonic microcrustaceans) and top predators (fish), to obtain an integral vision of AgNPs effects. Acute and chronic tests will be performed to evaluate and compare the lethal and sub-lethal effects of AgNPs in the selected biological models. Enzymatic stress biomarkers will be measured and AgNPs deposits in microalgae, microcrustaceans and fish will be analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Additionally, experiments will be carried out to analyze the potential for bioconcentration, bioaccumulation and trophic transfer between some of the test species. Through the results obtained, we aim to contribute to deepen advances on Nanoecotoxicology, a poorly developed area of knowledge both in our country and at a global level. Finally, protocols of effect will be developed for the evaluation of AgNPs ecological risk, using species of diverse structural and functional complexity, representatives of the regional aquatic systems and to compare them with international standards. The relevance of joining two lines of research so far underdeveloped in Argentina is highlighted: Ecotoxicology and Nanotechnology.

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano)

NANOEKOTOKIKOLOGIA
BIOMARCAORES
BIOINDICADORES
NANOPARTICULAS DE PLATA

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés)

NANOEKOTOKIKOLOGUY
BIOMARKERS
BIOINDICATORS
SILVER NANOPARTICLES

2 – Datos del Director/ar del Proyecto

- Nombre y Apellido

LUCIANA REGALDO

- Unidad Académica

FACULTAD DE HUMANIDADES Y CIENCIAS (FHUC-UNL)

- Teléfono oficial de contacto

54-9-0342-4575105 int. 128 (FHUC-UNL)
54-9-0342-4511627 (FHUC-UNL)

-Teléfono móvil de contacto

54-9-3404-524862; 54-9-342-4720152

-E-mail del Director/a del Proyecto

luregaldo@gmail.com; lregaldo@fhuc.unl.edu.ar; amgagneten@gmail.com

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describa la toma de muestras / datos a realizar



Ensayos de toxicidad con la microalga *Chlorella vulgaris* expuesta a nanopartículas de plata (NPsAg): El laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Humanidades y Ciencias (UNL) cuenta con una cepa de *C. vulgaris* (CLV2), importada desde el CICESE (*Scientific Research and Superior Education Center of Ensenada*, Baja California, México). Ésta especie será empleada para la realización de un test de inhibición del crecimiento algal, siguiendo protocolos estandarizados propuestos por la USEPA (2002). Con este ensayo se obtendrá la siguiente información: concentración efectiva a las 96 horas (96h-CE50, programa Probalg), tasa intrínseca de crecimiento (μ) y porcentaje de inhibición del crecimiento algal (% I). Además, se propone estudiar el efecto de las NPsAg sobre el estado fisiológico de las microalgas, a partir de la determinación de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y *b*, feofitina y carotenos, según APHA, 2012), de la eficiencia fotosintética (α ETR), de la velocidad máxima de transporte de electrones (ETR máx.) y del rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm). Estos análisis se realizarán con equipamiento sofisticado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga (España), bajo la supervisión de los Dres. Abdala Díaz y Avilés.

Ensayos de toxicidad con macrófitas (*Lemna gibba*) expuestas a NPsAg: Los cultivos y ensayos de toxicidad con *L. gibba* se realizarán siguiendo el protocolo de la OECD (2002). Las plantas se obtendrán de un ambiente acuático no contaminado del valle de inundación del río Paraná (Reserva de la Ciudad Universitaria – RECU- Santa Fe). Se realizará un cultivo monoclonal por reproducción vegetativa que se aclimatará a condiciones de laboratorio.

El objetivo de este ensayo será cuantificar los efectos de las NPsAg sobre el crecimiento vegetativo de *L. gibba*. Al inicio y final del ensayo, se registrará el número de frondas y de colonias, así como su apariencia (*e.g.* tamaño, necrosis, clorosis, gibosidad, ruptura de colonias o pérdida de flotabilidad, longitud de la raíz). Además, los efectos de las NPsAg serán evaluados en la biomasa final en base al área total de las frondas, mediante análisis de imágenes y del peso seco. Este ensayo permitirá calcular la CE50, la tasa media de crecimiento específico (μ), el % de inhibición del crecimiento (I_r, %) y el % medio de inhibición en la biomasa final (I_b, %). También se proponen analizar los pigmentos fotosintéticos en controles y tratamientos según APHA (2012).

Ensayos de toxicidad con microcrustáceos (*Ceriodaphnia dubia*) expuestos a NPsAg

Ejemplares de *C. dubia* serán colectados con redes de plancton (40 μ m) de ambientes acuáticos no contaminados (RECU, Santa Fe). Luego serán transportados a la facultad y adaptados a las condiciones de laboratorio: medio sintético (APHA 1998) y cámara de cultivo bajo condiciones controladas (T=23±1°C y fotoperíodo 16L:8O).

Los ensayos agudos (48 h de exposición a NPsAg) y crónicos (21 días de exposición a NPsAg) se realizarán siguiendo protocolos estandarizados propuestos por la USEPA (2002). Se registrará la mortalidad para calcular la CE50 a las 24 y 48 h. También se registrará el N° de organismos vivos y muertos, número de crías, edad de la primera reproducción y N° de mudas para evaluar sobrevivencia, fecundidad, madurez sexual y crecimiento, respectivamente.

Ensayos con peces (*Cnesterodon decemmaculatus*) expuestos a NPsAg

Especímenes de *C. decemmaculatus* se obtendrán de la RECU (Santa Fe). Después de la recolección, se aclimatarán durante 20 días en condiciones de laboratorio (16L:8O; T=24±1°C) con agua de grifo de clorada. Se proporcionará aireación artificial



y alimento comercial para peces *ad libitum* hasta el comienzo de los protocolos experimentales. Los peces serán mantenidos siguiendo las recomendaciones del Servicio Nacional Argentino de Normas Sanitarias y de Calidad de la Agricultura y Alimentación (SENASA 2013) 617/2002 para pruebas biológicas.

Las pruebas de toxicidad agudas y crónicas se realizarán según el protocolo propuesto por la USEPA (2002) y la OECD (1984), respectivamente. Previo al inicio de los ensayos, los animales serán medidos (longitud total; mm), pesados (mg) y asignados al azar a cualquiera de los distintos tratamientos. De este modo, la biomasa total por acuario podrá ser calculada. A su vez, se estimará la concentración letal (CL50) a las 24, 48, 72 y 96 h usando el método Probit (Finney 1978). Como indicadores morfométricos se calculará el Factor de Condición (FC).

Los ensayos crónicos permitirán registrar, además de la mortalidad, cambios en la natación, apariencia, coloración, reducción y/o cese de la alimentación.

Al finalizar el periodo de exposición, un subgrupo de animales de cada tratamiento será crioadestesiado y sacrificado por incisión del cordón medular por debajo del opérculo. Este método no interfiere con las mediciones de laboratorio, y está de acuerdo con los procedimientos descritos por la AVMA (2013) para la eutanasia de animales (Vera-Candioti y col. 2015; Bonifacio y col. 2017). Muestras de cerebro, hígado y branquias serán separadas y fijadas en frízer de -80°C hasta su preparación para medir la actividad enzimática. El índice hepatosomático (mg de hígado/mg de peso corporal) será valorado como un indicador de hipertrofia hepática (Sloof y col. 1983; Blazer y col. 2018).

Bioconcentración, bioacumulación y transferencia trófica: También se analizará la bioconcentración de NPsAg en microalgas, microcrustáceos y peces, según fuentes bibliográficas y experiencias del grupo de trabajo. Al finalizar el ensayo, un subgrupo de animales de cada tratamiento será crioadestesiado y sacrificado. Se cuantificarán las concentraciones de NPsAg en los modelos biológicos y en los medios de cultivo y se calculará el factor de bioconcentración (BCF). Además, se propone analizar la bioacumulación/biomagnificación de NPsAg en el siguiente sistema trófico simplificado: microalgas → microcrustáceos → peces. Se calculará el factor de bioacumulación (FBA).

Visualización de depósitos de NPsAg en microalgas, microcrustáceos y peces mediante MET: Para visualizar la posible internalización de NPsAg y alteraciones ultraestructurales inducidas por las NPs en los integrantes del sistema trófico simplificado mencionado, se obtendrán microfotografías con microscopio Jeol-1200 EX II-TEM microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan), del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Análisis químico de Ag: En todos los ensayos propuestos, el análisis químico de Ag producto de la disolución de las NPsAg se realizará por un método electroquímico, mediante voltametría de redisolución anódica (VRA) en el Laboratorio de Sensores y Biosensores (FBCB-UNL) (Kergaravat y col. 2018 y 2019).

Determinación de biomarcadores enzimáticos: Se determinarán marcadores de estrés metabólico (glutación S-transferasa– GST), de mecanismos de defensa antioxidante (enzima catalasa– CAT) y de neurotoxicidad (actividad de la acetilcolinesterasa– AchE), en los diferentes modelos biológicos propuestos.



<p>– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? (marque X)</p>	
X	NO
	SI. Elija una de las opciones:
	a) Se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes b) No se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible c) Existe un contrato con un tercero que impide la divulgación d) Otro. Justifique.
<p>– Período de Confidencialidad: Es el período durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El período máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público. Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con “X”.</p>	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
X	5 (CINCO) años
	Otro.
	Motivos:



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luciana Regaldo".

Dra. Luciana Regaldo

Profesora Adjunta
Investigadora Asistente de CONICET
Laboratorio de Ecotoxicología
Cátedras Gestión Ambiental y Ecotoxicología
Facultad de Humanidades y Ciencias
Universidad Nacional del Litoral
CP 3000. Santa Fe. Argentina
Tel. laboral +54-0342-4575105 (Int. 128)
Tel. particular Cel: +54-3404-524862
e-mail: luregaldo@gmail.com