

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (*Zea mays*)

Aldana Moyano

Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Argentina

Soledad Perez Catán

Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) - Centro Atómico Bariloche, Bariloche, Argentina

Cristina S. Pérez-Coll

Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Argentina / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

Teresa M. Fonovich

Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Argentina

RESUMEN

El creciente uso de nanomateriales en la industria, genera preocupación por la disposición final de sus residuos, una vez agotada su vida útil, así como la de los materiales utilizados para su síntesis, pudiendo generar impactos en diferentes organismos vivos. Estudiamos los efectos de suspensiones de nanomateriales de base gamma alúmina, simple (γ -Al₂O₃) y compuestos con incorporación de Ni nanométrico, además de soluciones de Ni, sobre plantas de maíz recién emergidas, en condiciones de laboratorio. El nanomaterial que no contenía níquel produjo una disminución del 59% en promedio, en el crecimiento de las raíces, las hojas y los tallos de las plantas y una muy elevada incorporación de Al y de Fe en sus raíces. El resto de los materiales causó incorporación de Ni, sin inhibición del crecimiento. Estudiamos además el perfil de fosfolípidos del suelo, cuyos resultados no permitieron relacionar los efectos observados con alteraciones en la microbiota como posibles responsables indirectas de los mismos.

Palabras clave: nanomaterial, aluminio, níquel, maíz, fosfolípidos.

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

The effects of gamma-alumina based nanomaterials on corn (Zea mayz) crops

ABSTRACT

The use of nanomaterials in industry is continually increasing and generating concern about the final disposal of their waste at the end of their life cycle, and also of their precursors, all of which are capable of impacting living organisms. We have studied the effects of nanomaterial suspensions based on gamma alumina, alone ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$), gamma alumina containing nanometric Ni, and nickel solutions, on newly emerged maize crops under laboratory conditions. The nickel-free material achieved an average inhibition of 59% of the growth of roots, leaves and shoots and a high incorporation of Al and Fe in its roots. The other nanomaterials caused the incorporation of nickel, without growth inhibition. We have also studied phospholipid profile of the soil, the results of which did not allow us to relate the observed alterations with alterations in the microbiota, which could probably be indirectly responsible for them.

INTRODUCCIÓN

Los nanomateriales de base gamma alúmina de alta área específica se caracterizan por su amplia capacidad de absorción. Son ampliamente utilizados en la industria, principalmente como soporte de catalizadores. Puede encontrarse descripciones de los beneficios de su uso en numerosas páginas de internet, incluidas algunas que lo promocionan en base a las bondades de un proceso de economía circular, que permite transformar materiales peligrosos en otros con aplicaciones en procesos medioambientales de remediación (Gil Bravo, 2020). No obstante, es aún muy escasa la bibliografía disponible acerca de los métodos apropiados para la disposición final y/o el posible reciclaje de los productos fabricados con estos nanomateriales u otros. Chicaiza Ortiz et al. (2021) discutieron recientemente las aplicaciones de diferentes catalizadores metálicos considerando su ciclo de vida y las posibilidades de disminuir el impacto ambiental que generan sus residuos. El estudio hace hincapié tanto en la generación de residuos gaseosos, líquidos y sólidos durante los procesos de síntesis como en las estrategias de revalorización y gestión de catalizadores agotados, indicando por ejemplo, que no es posible recuperar metales a partir de “alumina activa en alquilación” y que solo pueden gestionarse sus residuos como materia prima en cementeras.

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

Se han realizado diferentes evaluaciones ecotoxicológicas, incluyendo en anfibios, en los cuáles se demostró una variedad de efectos adversos causados por la exposición a nanomateriales de base gamma alúmina conteniendo Ni. Nuestro grupo de trabajo utilizó recientemente esos mismos nanomateriales y sus precursores en estudios con plantas. Demostramos así una disminución en la elongación de plántulas de *Solanum lycopersicum* (tomate), en ensayos en papel, además de inhibición de su crecimiento bajo condiciones del suelo normales y otras muy adversas para los microorganismos que pudieran ser beneficiosos para el desarrollo de esos cultivos, en respuesta a la exposición a la sal de Ni utilizada en su síntesis (Coll et al., 2022).

Por otra parte, describimos además la retención de estos materiales en el suelo (Fonovich et al, 2020; Bardi et al., 2022). En forma conjunta con los efectos de estos nanomateriales en anfibios (Svartz et al., 2019 y 2020) y sus efectos e incorporación en especies vegetales de consumo, como el tomate (Coll et al., 2022; Zambrano et al., 2021), dichos resultados permiten predecir además su potencial toxicidad en seres humanos, la cual ha sido considerada recientemente, pero solo en relación con la exposición laboral a los mismos (Argote, 2019).

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar tanto una posible alteración del crecimiento de las plantas de *Zea mays* (maíz) en respuesta a la exposición a nanomateriales de base gamma alúmina y un precursor de su síntesis, como la incorporación de dichos metales en las plantas de maíz, en cultivos tempranos realizados en condiciones de laboratorio. Como objetivo secundario se planteó la necesidad de evaluar, al menos en forma preliminar, sus probables efectos sobre los microorganismos del suelo, de manera sencilla e indirecta, a través de la evaluación de su contenido en fosfolípidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Cultivo y tratamientos de las plantas de maíz (Zea mays)

- Materiales y protocolos

Se llevaron a cabo 3 ensayos de cultivo de plantas de maíz en el laboratorio, para evaluar su crecimiento temprano, tomando como modelo el ensayo en suelo para plantas superiores, estandarizado en la norma IRAM-29118. Todos ellos por duplicado o triplicado de cada tratamiento. Las semillas de maíz (*Zea mays*), con denominación comercial Maíz dulce San Martín, fueron provistas por el proveedor local “La Germinadora”. Todos los cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones de laboratorio, a 24°C y con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los riegos de los cultivos control se realizaron con agua desionizada.

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

Se realizaron dos primeros ensayos con el fin de poner a punto el sistema y un tercer ensayo exponiendo las plantas a Al (en forma de nanomateriales (NMs)) y Ni (en forma de NMs y en sal en solución (no-NMs)). El primero de ellos (ensayo 1) consistió en tratar los cultivos con una sustancia tóxica de referencia ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), con el objetivo de comprobar la capacidad de las plantas de maíz de mostrar inhibición de su crecimiento en respuesta a alguna sustancia tóxica. En dicho ensayo se usaron recipientes de plástico pequeños a modo de macetas, rellenos con 150 g de suelo fértil comercial, y se realizaron los tratamientos durante 8 días y 32 mL totales de soluciones de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en concentraciones de la sal iguales a 50, 150, 450 y 1350 mg/L.

El segundo ensayo (ensayo 2) consistió exclusivamente en el cultivo de plantas control a diferentes tiempos, en recipientes plásticos más grandes conteniendo 400 g de suelo fértil comercial, diseñado para establecer la mejor relación tiempo de cultivo/masa de suelo, que permita trabajar durante la etapa lineal del crecimiento no solo de las partes aéreas, sino también de las raíces de las plantas, alcanzado un máximo de 40 días.

Finalmente se llevó a cabo el tercer ensayo (ensayo 3), en el cual se evaluaron los efectos de la exposición de las plantas de maíz a Al y Ni según se describió anteriormente. Se usaron recipientes plásticos conteniendo 300 g de una matriz de suelo que consistió en una mezcla preparada a partir de 50% de “suelo fértil comercial” y 50% de suelo natural de los alrededores de la localidad de Gan Gan (provincia de Chubut), cuyos contenido de carbono y granulometría fueron previamente determinados en nuestros laboratorios (Bardi et al., 2022).

Para los tratamientos se utilizaron 3 suspensiones acuosas conteniendo 100 mg/L nanomateriales (NMs) diferentes, todos de base gamma alúmina ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) y una solución acuosa de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ conteniendo 1000 mg/L de la sal (190 mg/L de Ni, cuantificado por espectrometría de Absorción Atómica) la cuál fue denominada Ni no nanomaterial (Ni no-NM), todas preparadas también en agua desionizada. Las suspensiones de nanomateriales se prepararon con nanomaterial simple de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (SNC), y compuestos de $\text{NiO}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (PNC), y $\text{Ni}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (NC) (Pérez Catán y Guraya, 2015), mediante sonicación durante 20 minutos a 24°C y fueron almacenadas a 4°C durante todo el experimento. Antes de realizar los riegos, tanto la solución de Ni no-NM como las suspensiones de NMs fueron llevadas a temperatura ambiente y agitadas. Los riegos se realizaron periódicamente sumando en todas ellas un volumen total de 170 mL, a lo largo de 21 días.

- Desarrollo, obtención y análisis del material vegetal de la matriz del suelo

Cada recipiente conteniendo la matriz de suelo fue llevado a capacidad de campo con agua desionizada. Tres días después se procedió a la siembra, colocando las semillas en los

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

recipientes y todos ellos fueron regados con agua desionizada durante los primeros días hasta comprobar la emergencia de las plantas. En el ensayo 2 se trabajó con 4 plantas por maceta y se continuó regando con agua desionizada durante todo el tiempo de exposición. En los ensayos 1 y 3, se trabajó con 4 y 2 plantas por maceta respectivamente; asimismo para el ensayo 3 se dispuso una maceta control que contenía 4 plantas. Se dio inicio a los tratamientos alrededor de los 8 a 11 días a partir de la siembra. Las suspensiones/solución se colocaron directamente sobre el suelo de cada recipiente, de modo que las mismas nunca tocaron las hojas ni las partes superiores de los tallos. Al finalizar cada ensayo, se separaron las partes aéreas de las plantas en conjunto (ensayos 1 y 2) o separando los tallos de las hojas (ensayo 3) y las raíces, para luego obtener sus masas húmedas. A continuación se liofilizó todo el material de los ensayos 2 y 3, se obtuvieron las masas secas correspondientes y posteriormente se realizó la cuantificación metales según se detalla abajo.

Una vez retiradas las plantas, se separaron además muestras de las matrices de suelo de cada replicado (aproximadamente 100 g) y se destinaron a la preparación de extractos lipídicos para la posterior cuantificación de fósforo fosfolipídico total y la separación final de fosfolípidos individuales presentes en dicha matriz. Alícuotas del suelo restante (aproximadamente 200 g) de cada replicado fueron utilizadas para cuantificar Al, Ni y otros metales, luego de su secado a temperatura ambiente.

B) Cuantificación de Ni, Al, Fe, Zn y Cu en plantas y suelos

Réplicas de material seco se reunieron en un pool para cada tratamiento, tanto plantas como suelos, y se redujeron a pequeños trozos en mortero de ágata. Seguidamente los pools fueron sometidos a digestión ácida en un digestor de microondas (BERGOF Speed Wave SW-4, QM-DIG-002). Dos alícuotas de cada digerido fue llevado a volumen con agua calidad MQ para su cuantificación

. Las determinaciones se llevaron a cabo por espectrometría de emisión óptica (OES) de plasma acoplado inductivamente (ICP) utilizando un equipo Agilent 5110. QM-EE0-001; para la calibración se utilizó solución estándar multi-elemento de metales Merck (Lote HC90682355).

C) Determinación de fósforo fosfolipídico y separación de fosfolípidos individuales del suelo

Muestras de suelo húmedo cada maceta de aproximadamente 100 g fueron separadas al final del ensayo y homogeneizadas en mortero. Se tomaron alícuotas de 1,5 g de cada una de las muestras y se secaron en liofilizador; a continuación se prepararon extractos lipídicos utilizando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). Luego de sucesivos lavados, los

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

extractos fueron evaporados a sequedad bajo corriente de nitrógeno gaseoso y resuspendidos en 100 ul de mezcla de cloroformo:metanol (2:1). Alícuotas de 5 ul de cada extracto fueron utilizadas para determinar la concentración de fósforo fosfolipídico y el resto se usó para formar pooles reuniendo los replicados de cada tratamiento, para realizar a continuación la separación de fosfolípidos individuales mediante cromatografía bidimensional en capa delgada, utilizando placas de sílica gel en soporte de vidrio, de acuerdo al método de Rouser et al. (1970). Los fosfolípidos individuales se identificaron por comparación con una mezcla de estándares provista por SIGMA-Aldrich.

D) Estadística

El análisis comparativo del crecimiento de las plantas y de la concentración de metales en suelo se realizó mediante ANOVA.

Los resultados de las mediciones de concentración de metales en las plantas se analizaron en base a la información proporcionada sobre los límites de detección y de cuantificación de cada elemento, que se presentan en la tabla 1.

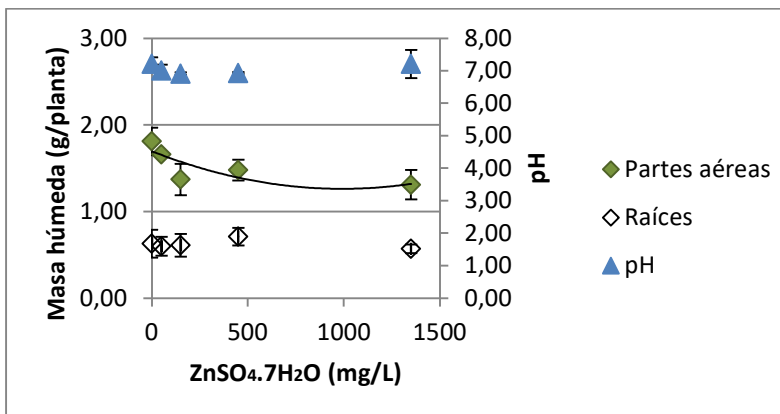
RESULTADOS

La figura 1 muestra la curva de inhibición del crecimiento de plantas de maíz expuestas a la sustancia de referencia $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, expresada como biomasa (masa húmeda). Los resultados permitieron observar una respuesta dependiente de la concentración en las partes aéreas de las plantas, alcanzando una inhibición máxima de aproximadamente el 27% para las plantas tratadas con 1350 g/L de la sal. Las raíces, en cambio, no permitieron evidenciar un efecto de la sustancia tóxica de referencia, mientras que pudo observarse un gran crecimiento de las mismas en las condiciones de dicho ensayo, mostrando la insuficiencia del tamaño de las macetas y la cantidad de suelo en que se realizaron dichos cultivos. El pH de los suelos no mostró cambios debidos a los tratamientos.

Figura 1 – Efecto de la exposición de plantas de maíz durante 8 días, al tratamiento con una sustancia tóxica de referencia ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sobre el crecimiento de las mismas. Los resultados expresan los promedios de la masa húmeda de partes aéreas y raíces (g/planta). Se muestra también el pH promedio del suelo en cada tratamiento. ANOVA: $p < 0,0089$ para la masa de las partes aéreas en función de la concentración de la sustancia de referencia.

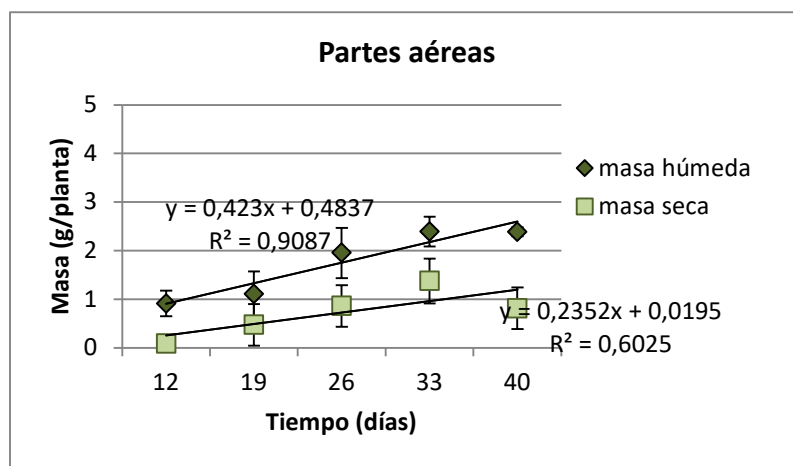
Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)



Se realizó la puesta a punto con muestras control para definir las condiciones de trabajo dentro de la zona lineal de crecimiento, tanto para las partes aéreas como las raíces de las plantas; los resultados de las masas húmedas como las secas se muestran en la figura 2. Puede observarse una respuesta lineal para las partes aéreas en ambos casos y para las raíces solo en las masas húmedas, bajo las nuevas condiciones de tamaño de las macetas y cantidad de suelo presente en las mismas (400 g en lugar de 150 g).

A partir de este resultado se eligió un tiempo de exposición prolongado para llevar a cabo el ensayo definitivo (ensayo 3), dentro del rango estudiado en el ensayo 2, siendo el mismo de 21 días de exposición, el cual reflejaba un tiempo total de los cultivos de 32 días. La figura 3a muestra la imagen de una maceta de plantas de maíz control.



Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

Figura 2 – Curvas de crecimiento de cultivos control de plantas de maíz. Los resultados se expresan como g/planta y representan los promedios de las masas húmedas y las masas secas para cada tratamiento, tanto de partes aéreas como de raíces, por separado.

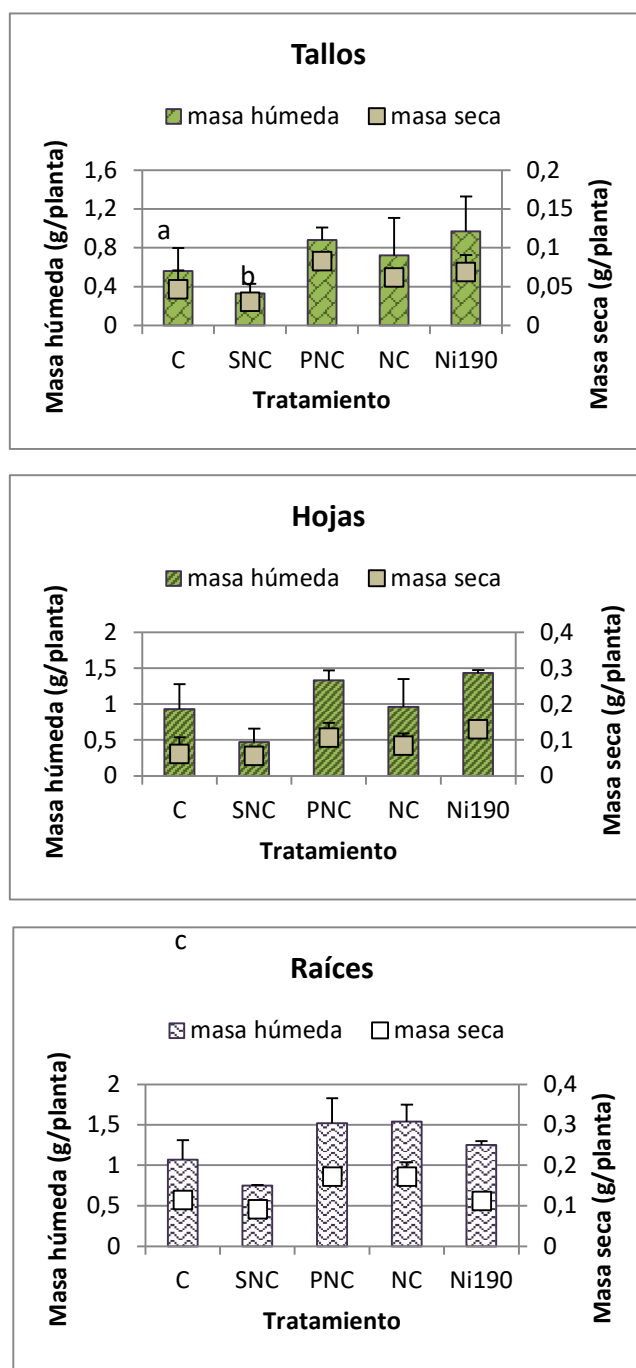
En la figura 3b se observan las masas húmedas y secas correspondientes a diferentes órganos (raíces, tallos y hojas) de plantas de maíz sometidas a los tratamientos descriptos para el ensayo 3 y plantas controles. Pueden observarse diferencias significativas entre los tratamientos para las masas húmedas de los 3 órganos estudiados: ANOVA: tallos: $p < 0,0513$, hojas: $p < 0,0288$ y raíces: $p < 0,0463$. No así para sus masas secas, pudiendo concluirse que el indicador más apropiado para realizar esas comparaciones es la masa húmeda. Las respuestas fueron muy similares en raíces, tallos y hojas. El tratamiento con SNC y los controles mostraron un crecimiento menor de las plantas, presentando los valores más bajos, con $p < 0,05$ para controles: a) respecto de Ni 190; y $p < 0,05$ para SNC: b) respecto de PNC y Ni 190, c) respecto de PNC y NC.



Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

Figura 3a – Fotografía de una maceta del ensayo 3, tomada a los 21 días de cultivo, conteniendo 4 plantas de maíz “Control”.



Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

Figura 3b – Efecto de la exposición de plantas de maíz durante 21 días (ensayo 3), al tratamiento con diferentes suspensiones de nanomateriales de base gamma alúmina (SNC, PNC y NC) (100 mg/L) y una solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1000 mg/L) conteniendo 190 mg/L de Ni, sobre el crecimiento de las mismas. Los resultados expresan los promedios de la masa húmeda y seca de tallos, hojas y raíces (g/planta) en cada tratamiento. ANOVA: masa húmeda de tallos: $p < 0,0513$ entre tratamientos; masa húmeda de hojas: $p < 0,0288$ entre tratamientos; masa húmeda de raíces: $p < 0,0463$ entre tratamientos. a, b y c: $p < 0,05$.

El análisis de la concentración de Al y Ni presentes en el suelo (Al y Ni cuantificados) al finalizar el ensayo 3, en forma comparativa con la concentración de dichos metales agregada a través de los tratamientos (Al y Ni agregados), se muestra en la figura 4. El Ni cuantificado mostró concentraciones comparables a las del metal agregado al suelo (en PNC, NC y N 190), mientras que el Al agregado al suelo (en SNC, PNC y NC) fue insignificante respecto de su concentración cuantificada.

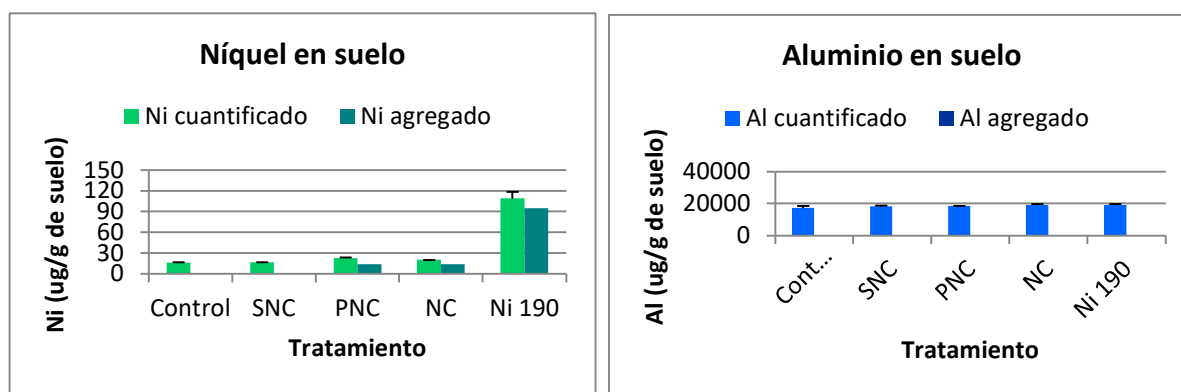


Figura 4 – Concentración de metales en suelos al finalizar los tratamientos durante 21 días (ensayo 3) con diferentes suspensiones de nanomateriales de base gamma alúmina (SNC, PNC y NC) (100 mg/L) y una solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1000 mg/L) conteniendo 190 mg/L de Ni. Se muestran las concentraciones de Ni y Al cuantificados; y Ni y Al agregados al suelo durante el tratamiento. Los resultados se expresan en ug del metal/g de suelo (masa seca).

Además de Al y Ni, se cuantificó el Fe presente en el suelo de las macetas. Sus valores no fueron diferentes entre los suelos controles y los tratados, alcanzando el siguiente valor: 27921 ± 1126 ug/g de suelo (promedio $\pm$ SD).

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

La figura 5 muestra las concentraciones de Al y Ni (metales que fueron agregados al suelo a través de los tratamientos), además de la concentración de Fe, en las plantas de maíz. La incorporación de los 3 metales fue muy superior en las raíces, en comparación con las de los tallos y las hojas, en todos los tratamientos y en los controles. La incorporación de Ni fue muy superior en las plantas tratadas con Ni190, respecto del todas las demás, incluyendo las tratadas con NMs conteniendo Ni (PNC y NC). Por otra parte, las concentraciones de Al y de Fe mostraron un patrón similar, con valores muy elevados en las plantas tratadas con SNC, respecto del resto de los tratamientos y de los controles.

El análisis de la concentración de Al y Ni presentes en el suelo (Al y Ni cuantificados) al finalizar el ensayo 3, en forma comparativa con la concentración de dichos metales agregada a través de los tratamientos (Al y Ni agregados), se muestra en la figura 4. El Ni cuantificado mostró concentraciones comparables a las del metal agregado al suelo (en PNC, NC y N 190), mientras que el Al agregado al suelo (en SNC, PNC y NC) fue insignificante respecto de su concentración cuantificada.

En el caso de la figura 5, los gráficos muestran las concentraciones medidas también en los pools de cada órgano de las plantas, para cada tratamiento. Las mediciones se realizaron por duplicado y se informaron los límites de detección y límites de cuantificación que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 – Límites de cuantificación (LC) y detección (LD) de metales en plantas. Se muestran los mínimos y máximos, correspondientes al total de las mediciones de concentraciones de metales en raíces, tallos y hojas de plantas de maíz, para cada metal.

	Al (ug/g)		Fe (ug/g)		Ni (ug/g)	
	LD	LC	LD	LC	LD	LC
Mínimo	0,10	0,40	0,20	0,60	0,20	0,50
Máximo	0,90	2,90	1,40	4,70	1,20	4,00

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

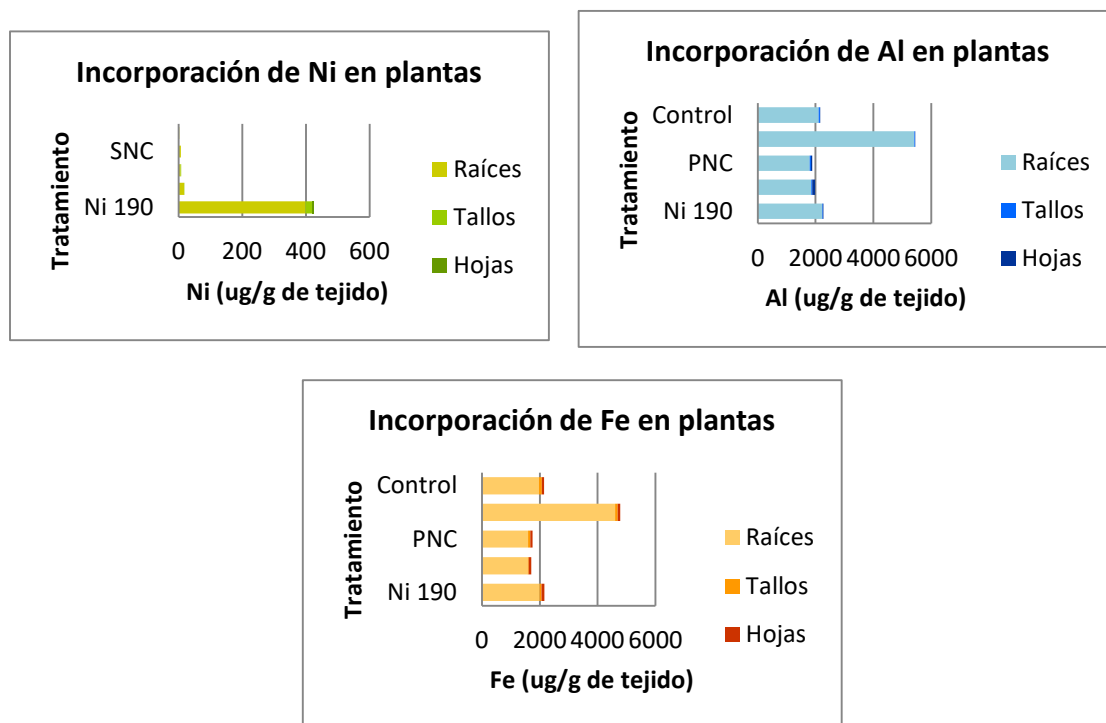


Figura 5 – Concentración de níquel (Ni), aluminio (Al) e hierro (Fe) en raíces, tallos y hojas de plantas de maíz luego del tratamiento durante 21 días (ensayo 3) con diferentes suspensiones de nanomateriales de base gamma alúmina (SNC, PNC y NC) (100 mg/L) y una solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1000 mg/L) conteniendo 190 mg/L de Ni. Los resultados se expresan en ug del metal/g de tejido (masa seca).

El análisis del contenido de fosfolípidos del suelo se realizó a través de la cuantificación de fósforo fosfolipídico y sus resultados se muestran en la figura 6. Su concentración fue significativamente diferente entre los tratamientos (ANOVA: $p < 0,0208$), con a): $p < 0,05$ entre PNC, NC, Ni 190 y los suelos controles. La figura 7 muestra, 3 fotografías correspondientes a la separación preliminar de fosfolípidos del suelo, realizada mediante cromatografía bidimensional en placas de sílica gel. Se observan las placas correspondientes a una mezcla de estándares, un suelo Control y un suelo tratado con NC. El fosfolípido difosfatidilglicerol (DPG por su nombre en inglés: di phosphatidyl glicerol) también llamado cardiolipina no formaba parte de la mezcla citada, por ese motivo, la banda correspondiente

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

a DPG se identificó por comparación con otras separaciones cromatográficas realizadas previamente.

Pueden observarse claramente los fosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE por su nombre en inglés: Phosphatidyl ethanolamine) y fosfatidilcolina (PC por su nombre en inglés: phosphatidyl choline) en las placas Control (B) y tratada con NC (C) y con una tinción muy clara la banda correspondiente a fosfatidilinositol (PI por su nombre en inglés: phosphatidyl inositol), además de DPG. No se muestra el resto de las placas debido a que, al igual que las dos mostradas, no permitieron observar diferencias en la tinción de ninguna de las bandas identificadas.

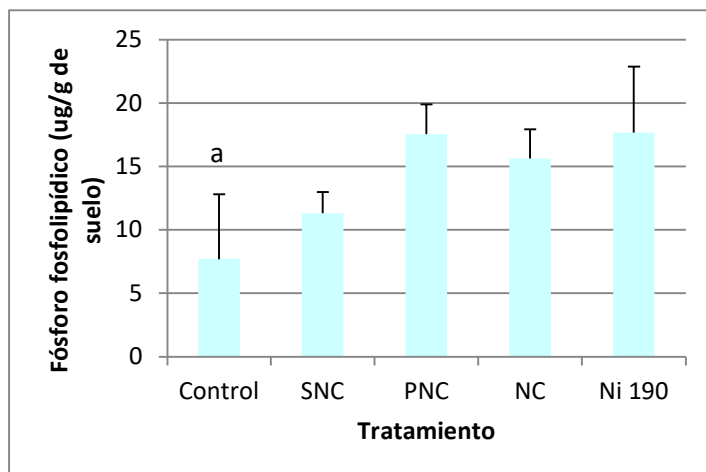


Figura 6 – Fósforo cuantificado en extractos de fosfolípidos del suelo luego del tratamiento durante 21 días (ensayo 3) con diferentes suspensiones de nanomateriales de base gamma alúmina (SNC, PNC y NC) (100 mg/L) y una solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1000 mg/L) conteniendo 190 mg/L de Ni. Los resultados se expresan como fósforo fosfolipídico en ug/g de suelo (masa seca). ANOVA: $p < 0,0208$), a): $p < 0,05$ entre PNC, NC, Ni 190 y los suelos controles.

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

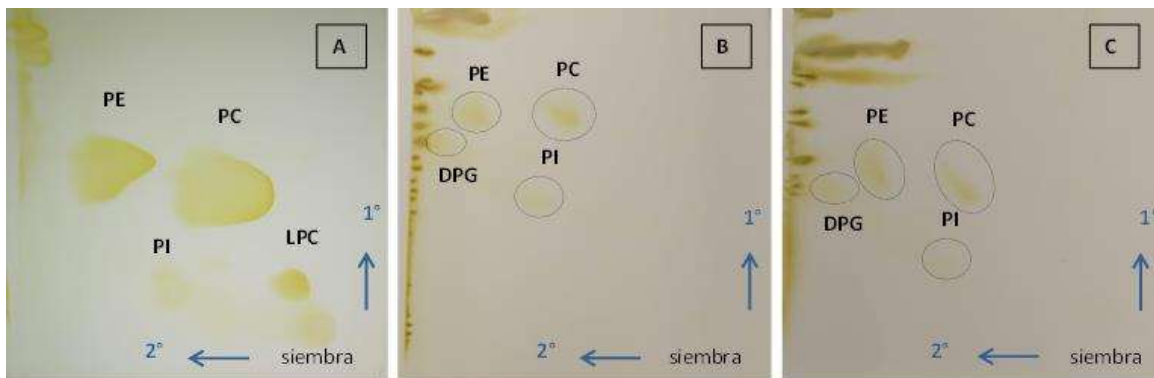


Figura 7 – Separación de fosfolípidos mediante cromatografía bidimensional en capa delgada. A- mezcla de estándares de fosfolípidos (SIGMA). B – suelo control. C – suelo tratado con NC. PC: Fosfatidilcolina, LPC: lisofosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, DPG: difosfatidilinositol o cardiolipina.

DISCUSIÓN

Nuestro grupo de trabajo se ha especializado en la última década, en la evaluación ecotoxicológica de los efectos de precursores de la síntesis y de nanomateriales de base gamma alúmina, sintetizados y caracterizados en nuestros laboratorios. Hemos trabajado en suelos en escala de laboratorio, a través del uso de lisímetros y con plantas de tomate, mediante un ensayo estandarizado, de elongación de raíz e hipocotilo en papel y también a través de un ensayo estandarizado de cultivo de plantas en macetas.

Aquellos resultados permitieron observar retención de Ni en el suelo de lisímetros, tanto en uno tratado con una sal de níquel (Fonovich et al., 2020) como en otro tratado con PNC (Bardi et al., 2022). En forma simultánea, se pudieron evidenciar concentraciones similares de Al en los lisímetros tratados y en los controles, en concordancia con la elevada concentración natural del metal en los suelos y perfiles de elución y retención de Fe natural del suelo, que acompañaban a los de Al. Pudimos demostrar además que el tratamiento con Ni en forma de sal y en forma de PNC y NC, fue responsable de su incorporación; al igual que el tratamiento con Al en forma de alúminas ácida y básica formando parte de SNC y PNC, en plántulas de tomate (ensayos en papel) (Coll et al., 2022). Los ensayos con tomate en suelo mostraron inhibición del crecimiento de las plantas y clorosis, solo en las tratadas con Ni 190, tanto en las cultivadas en una mezcla de suelo “envejecida”, con probable pérdida de microbiota, como en cultivos en suelo “normal”.

Los resultados del presente trabajo permiten evidenciar diferencias en la incorporación y en los efectos de los mismos materiales (nanométricos y no nanométricos) entre la especie

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

estudiada anteriormente: *Solanum lycopersicum* (tomate) y la actual: *Zea mays* (maíz). A diferencia del ensayo con tomate, no se trabajó en esta oportunidad con maíz en ensayos en papel, debido a la extrema complejidad que presentó la medición de la longitud de su raíz en un ensayo preliminar. De modo que en esta oportunidad, se estudió la incorporación de metales en las plantas cultivadas en suelo (figura 5). La incorporación de Al pudo identificarse en todas las plantas tratadas y también en plantas control, debido al alto contenido de ese metal en los suelos. Un hallazgo fue la importante diferencia encontrada en la incorporación del metal debido al tratamiento de las plantas de maíz con SNC, respecto del resto. Como puede observarse en la figura 4, el Al agregado al suelo fue insignificante respecto del Al presente en forma natural, de modo que la incorporación aumentada en las plantas tratadas con SNC no dependió de la concentración del metal en el suelo, sino más bien de su presencia en ese nanomaterial en particular. Así mismo, los resultados permiten sugerir que dicha incorporación, sumada o no a la de Fe, que presentó un perfil similar en las plantas acompañando al Al, pudo haber sido responsable de la inhibición del crecimiento de las plantas.

Estos resultados concuerdan con los hallados por Ahmed et al. (2022), quienes demostraron la incorporación de nanopartículas de Al_2O_3 , agregados de nanopartículas de Al_2O_3 y Al^{3+} en plantas de maíz cultivadas en suelo y en hidroponia, con diferencias entre ambos tipos de cultivos. Los autores demostraron también diferentes grados de toxicidad de esos nanomateriales, a través de inhibición del crecimiento de las plantas y efectos sobre algunos biomarcadores.

En el caso del Ni, las concentraciones medidas en los diferentes suelos sí guardaron una estrecha relación con las concentraciones del metal agregadas a los mismos. En cuanto a los cultivos de maíz, observamos una altísima incorporación en las plantas tratadas con Ni 190, y una incorporación menor, pero todavía superior a la de las plantas control y las tratadas con SNC (nanomaterial que no contiene Ni), en aquellas tratadas con PNC y NC. Contrario a lo ocurrido en los estudios anteriores con las plantas de tomate, no se observó un efecto adverso en el crecimiento de las plantas de maíz, debido a tratamiento con Ni nanométrico o no nanométrico. Estos resultados también contrastan con los de Rehman et al. (2016) quienes realizaron un trabajo partiendo de la toxicidad del Ni en cultivos de maíz y probando diferentes pretratamientos para disminuirla. Muy probablemente las diferencias en las respuestas guarden una relación con la diferente sensibilidad del maíz respecto del tomate (nuestros trabajos) y la concentración en el suelo, además del tiempo de exposición (Rehman et al., 2016). Dichos autores trabajaron con un diseño diferente, aplicando al suelo, una concentración de 160 mg/kg de Ni, en forma de $NiCl_2$, y permitiendo llegar al equilibrio durante 100 días anteriores a la aplicación de los tratamientos y la siembra de las semillas;

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

mientras que nuestra concentración máxima agregada fue inferior ($95 \text{ ug/g} = 95\text{mg/kg}$) y fue aplicada a lo largo del riego solo durante 21 días (ensayo 3), iniciando el mismo cuando las plantas ya habían emergido.

Finalmente cabe mencionar que no se observó clorosis en ninguna de las plantas del ensayo y hacer notar que, en todos los casos, la incorporación de ambos metales, Ni y Al, fue muy superior en las raíces respecto de los tallos y hojas.

La evaluación preliminar del contenido de fosfolípidos en el suelo, a partir de su extracción y la cuantificación de fósforo fosfolipídico permitió observar un aumento del mismo en los tratamientos con suspensiones de nanomateriales conteniendo Ni y con Ni 190, no así con SNC. Este resultado indicaría un aumento en el metabolismo de dichos lípidos, que podría estar relacionado a la exposición de los microorganismos del suelo al Ni en cualquiera de sus formas (nanométrica y no nanométrica). La separación de fosfolípidos individuales en nuestros suelos mostró un patrón similar al descripto por otros autores, con PE y PC como fosfolípidos mayoritarios, además de PI y DPG (o cardiolipina: CL), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) y ácido fosfatídico (PA) (Siebers et al., 2018). López (2016) y Siebers et al. (2018) describieron un aumento en la concentración de ácido fosfatídico y una disminución en CL, en suelos expuestos a detergentes y debido a la muerte masiva y descomposición de los microorganismos, respectivamente. En nuestro caso, no evidenciamos PA, debido a que es un fosfolípido muy minoritario, por lo cual frecuentemente es necesario realizar la extracción con cantidades mayores de muestra y separar los fosfolípidos de forma secuencial, para poder visualizarlo. Por este motivo y debido a que no evidenciamos cambios cualitativos en las placas cromatográficas, para los fosfolípidos visualizados, consideramos este ensayo como “preliminar” y sugerimos la necesidad de realizar uno nuevo, ajustando el método de extracción.

A manera de conclusión podemos decir que la aplicación de SNC a los suelos de los cultivos causó una disminución del crecimiento de las plantas de maíz, probablemente debida a la incorporación de Al y/o Fe en sus raíces; y no causó efecto sobre los microorganismos del suelo. Por otra parte tanto el Ni nanométrico como el no nanométrico fueron incorporados en las plantas. La exposición de las mismas a dicho metal a través del suelo no causó un efecto sobre su crecimiento, ya sea en forma directa (incorporación de Ni) o indirecta a través de un efecto adverso sobre la microbiota. Probablemente pueda observarse toxicidad del Ni en plantas de maíz, bajo condiciones de exposición más prolongadas para llegar a obtener granos, como lo hicieron Shahbaz et al. (2018) y/o a mayores concentraciones de los materiales que lo contienen, que también permitirían evaluar concentración del metal en los mismos, con el objetivo de establecer o no el riesgo para la salud humana y de animales, que implicaría su consumo.

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado a través del subsidio ANPCyT: PICT 2017-0706.

REFERENCIAS

- Ahmed, Bilal, Asfa Rizvi, Asad Syed, Vishnu D. Rajput, Abdallah M. Elgorban, Salim S. Al-Rejaie, Tatiana Minkina, Mohammad Saghir Khan y Jintae Lee (2022). Understanding the phytotoxic impact of Al^{3+} , nano-size, and bulk Al_2O_3 on growth and physiology of maize (*Zea mays* L.) in aqueous and soil media. *Chemosphere*, 2022, volumen 300. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653522010487> [Fecha de consulta: 19 de octubre de 2023]
- Argote, José Ignacio (2019). Nanomateriales: riesgos para la salud y recomendaciones en el manejo de nanopartículas en entornos laborales. *Interempresas. Protección laboral*. Disponible en <https://www.interempresas.net/Proteccion-laboral/Articulos/250630-Nanomateriales-riesgos-salud-recomendaciones-manejo-nanoparticulos-entornos-laborales.html> [Fecha de consulta: 19 de octubre de 2023]
- Bardi, Hernán Mariano, Cristina Silvia Pérez Coll, Susana Nievas, Soledad Perez Catán y Teresa Mabel Fonovich (2022). “Metals in soil treated with gamma alumina-based nanomaterials. Retention and availability of aluminium, iron and nickel”. En *International Journal of Life Science Research Archive*, 2022, volumen 3, número 1, páginas 64–69. DOI: <https://doi.org/10.53771/ijlsra.2022.3.1.0066>. Disponible en <https://sciresjournals.com/ijlsra/sites/default/files/IJLSRA-2022-0066.pdf> [Fecha de consulta: 9 de octubre de 2023]
- Coll, Tamara Anahí, Soledad Perez Catán, Marina Gosatti, Aldana Moyano, Monica Guraya, Cristina Pérez Coll y Teresa Mabel Fonovich (2022). “Growth responses of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) to aluminium and nickel from nanoparticle suspensions and ionic solutions”, En *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 2022, Resumen disponible en <https://doi.org/10.1080/15320383.2022.2134293>. [Fecha de consulta: 9 de octubre de 2023]
- Chicaiza Ortiz, Cristhian David, Kimberly Valeria Salazar García, Karel Diéguez Santana, Ángel Fabián Chicaiza Ortiz, Vanessa Pamela Navarrete Villa, Jingxin Zhang (2021). Aplicaciones de los catalizadores y su evaluación a través de análisis de ciclo de vida. *Revista Ciencia UNEMI*, 2021, volumen 14, número 37, páginas 60 – 72.

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

Disponible en <file:///C:/Users/Notebook%20Teresa/Downloads/Dialnet-AplicacionesDeLosCatalizadoresYSuEvaluacionATraves-8377281.pdf> [Fecha de consulta: 19 de octubre de 2023]

Fonovich, Teresa Mabel, Cristina Silvia Pérez Coll, Lucila Blanco Bermudez, Mónica Guraya, Gisela Cappari y Soledad Pérez Catán (2020). Fate of aluminium and nickel in soil. Evaluation through lysimeters under laboratory conditions. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, Resumen disponible en <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15320383.2020.1828264> [Fecha de consulta: 19 de octubre de 2023]

Gil Bravo, Antonio (2020). Residuos peligrosos derivados del aluminio transformados en materiales con aplicaciones medioambientales. *Revista Técnica de Medio Ambiente (RETEMA)*. Disponible en <https://www.retema.es/actualidad/residuos-peligrosos-derivados-del-aluminio-transformados-materiales-aplicaciones> [Fecha de consulta: 20 de octubre de 2023]

López, Gastón A. (2016). Cambios en la composición lipídica de *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) inducidos por compuestos de amonio cuaternario sintéticos y su relación con la capacidad de biodegradar estos compuestos [Tesis Doctoral]. <https://repodigital.unrc.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/75065/75065.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pérez Catán, Soledad y Mónica M. Guraya (2015). "High porous gamma-alumina synthesized by a modified sol-gel technique". *Int. J. Mater. Sci*, 2015, volumen 5, número 2, páginas 33–39. DOI:10.12783/ijmsci.2015.0502.01.

Rehman, Muhammad Zia-ur, Muhammad Rizwan, Shafaqat Ali, Nida Fatima, Balal Yousaf, Asif Naeem, Muhammad Sabir, Hamaad Raza Ahmad, Yong Sik Ok (2016). Contrasting effects of biochar, compost and farm manure on alleviation of nickel toxicity in maize (*Zea mays* L.) in relation to plant growth, photosynthesis and metal uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, volumen 133, páginas 218–225.

Rouser, George, Sidney Fleischer y Akira Yamamoto (1970). "Two dimensional thin layer chromatographic separation by polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots". *Lipids*, 1970, volumen 5, número 5, páginas 494-496.

Shahbaz, Ali Khan, Karolina Lewinska, Javed Iqbal, Qasim Ali, Mahmood-ur-Rahman, Muhammad Iqbal, Farhat Abbas, Hafiz Muhammad Tauqeer, Pia Muhammad Adnan Ramzani (2018). Improvement in productivity, nutritional quality, and antioxidative defense mechanisms of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and maize (*Zea mays* L.) in nickel contaminated soil amended with different biochar and zeolite ratios. *Journal of Environmental Management*, 2018, volumen 218, páginas 256-270.

Moyano, A; Pérez Catán, S; Pérez-Coll, C; Fonovich, T.

Efectos de nanomateriales de base gamma alúmina sobre cultivos de maíz (Zea mays)

- Siebers, Meike, Thomas Rohr, Marina Ventura, Vadim Schütz, Stephan Thies, Filip Kovacic, Karl-Erich Jaeger, Martin Berg, Peter Dörmann, Margot Schulz (2018). Disruption of microbial community composition and identification of plant growth promoting microorganisms after exposure of soil to rapeseed-derived glucosinolates. *PLoS ONE*, 2018, volumen 13, número 7: e0200160. Disponible en <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0200160> [Fecha de consulta: 20 de octubre de 2023]
- Svartz Gabriela, Carolina Aronzon, Soledad Perez Catán, Sonia Soloneski y Cristina Pérez Coll (2020). Oxidative stress and genotoxicity in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles after acute exposure to Ni-Al nanoceramics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020, volumen 80, 103508. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103508> [Fecha de consulta: 23 de octubre de 2023]
- Svartz, Gabriela, María Teresa Sandoval, Marina Gosatti, Soledad Perez Catán y Cristina Pérez Coll (2019). Lethality, neurotoxicity, morphological, histological and cellular alterations of Ni-Al nanoceramics on the embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2019, volumen 69, páginas 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.02> [Fecha de consulta: 23 de octubre de 2023]
- Zambrano Débora, Teresa M. Fonovich, Lucila Blanco Bermudez, Mónica Guraya, Cristina Perez Coll y Soledad Perez Catán (2021). New Approach to γ -Al₂O₃, NiO/ γ -Al₂O₃ and Ni/ γ -Al₂O₃ Nanoparticles Toxicity in Tomato-Plants (*Lycopersicon esculentum*) by Means of Electron Microscopy Techniques. SETAC Latin America 14th Biennial Meeting. Virtual. 26 al 29 de Septiembre de 2021.