

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE NANOMATERIALES EN CHINCHES DE CAMA (*Cimex lectularius*)

Ortiz Blanche, María E.¹; Cáceres, Mariano¹; Vassena, Claudia V.¹²; Santo Orihuela, Pablo L.¹³.

¹División de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (DIPEIN) - DEIBIOTOX - CITEDEF - UNIDEF - CONICET, MINDEF, San Juan Bautista de La Salle 4397 (1603), Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Ingeniería e Investigaciones Ambientales - Universidad Nacional de San Martín, Campus Miguelete, 25 de Mayo y Francia (1650), San Martín, Buenos Aires, Argentina.

³Cátedra de Química Analítica Instrumental - Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires, Junín 954 (1113), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Abstract. Con el objetivo de estudiar el efecto tóxico de diferentes nanomateriales como alternativa al uso de insecticidas convencionales, se sintetizaron nanopartículas de óxido de silicio esféricas (SiNPs), basándose en el método de Stöber. La caracterización por microscopía electrónica (SEM y TEM) de las SiNPs permitió determinar que se obtuvieron nanopartículas de tamaño de 20 nm y mayores a 200 nm, con carga superficial negativa. Posteriormente, se realizaron ensayos de exposición a diferentes concentraciones de SiNPs resuspendidas en acetona, mediante tres técnicas diferentes: aplicación tópica, en superficie de vidrio mediante recubrimiento y en forma de polvo, en chinches de cama (*Cimex lectularius*). El tiempo de exposición fue de una hora y se evaluó la mortalidad hasta los 14 días posteriores. Los resultados obtenidos evidenciaron que no hubo un efecto significativo del tamaño de las SiNPs en la mortalidad de los insectos. En cambio, sí se observó una mortalidad significativamente mayor cuando las SiNPs fueron aplicadas en forma de polvo sobre el vidrio, en base a estos resultados se buscará determinar el mecanismo de acción diferencial de las SiNPs que posiblemente se relaciona con daño o deshidratación a nivel cuticular. Además, se realizarán más ensayos para evaluar su potencial aplicación en campo.

Palabras claves: Nanopartículas de silicio, nanotoxicología, chinches de cama.

1. Introducción.

La nanotecnología es la ciencia dedicada al desarrollo y producción de nanomateriales de diversa composición, cuyas dimensiones incluye al menos una escala nanométrica. En la actualidad, la nanotecnología ha adquirido una gran relevancia por los avances que promete en diversas áreas, y su posible aplicación en nuestro campo no es la excepción.

Las chinches de cama (*Cimex lectularius*) son insectos ectoparásitos que se alimentan exclusivamente de la sangre de aves y mamíferos, principalmente durante la noche. Durante el día, se refugian en lugares cercanos al hospedador, como los pliegues del colchón, cavidades en las paredes, o los apliques cercanos a la cama, entre otros. En el ser humano, pueden producir trastornos significativos, principalmente de origen psicológico, como estrés y ansiedad, debido a la picazón provocada por sus picaduras. Desde hace años, se ha monitoreado su resistencia a diversos insecticidas, como piretroides y organofosforados, debido al uso intensivo y la presión de selección ejercida. Por ello, el presente trabajo se enfoca en la búsqueda de alternativas para abordar esta problemática, evaluando la toxicidad de nanopartículas de sílice esféricas (SiNPs) como una posible alternativa a los insecticidas de uso habitual.

2. Materiales y métodos.

2.1 Chinches de cama (*Cimex lectularius*).

En el CIPEIN, se ha criado durante más de 10 años la cepa de referencia "Harold Harlan" en condiciones controladas de temperatura y humedad. Esta cepa es susceptible nunca ha sido expuesta a insecticidas. Para los bioensayos, se seleccionaron individuos adultos, preferentemente machos, y ninfas de los estadios 4º y 5º, y con diferentes períodos de ayuno.

2.2 Síntesis nanopartículas de óxido de silicio (NpSiO₂) esféricas.

Para la síntesis de SiNPs se emplea una adaptación del método de Stöber [1]. La síntesis consiste en la obtención de nanopartículas de distintos tamaños aproximados (18, 60 y 108 nm), con carga superficial negativa. Brevemente, se empleó etanol absoluto, hidróxido de amonio, agua bidestilada y TEOS (Ortosilicato de tetraetilo), en agitación continua durante 24 h a 600 rpm. Cabe destacar que modificando las cantidades utilizadas de cada reactivo se pueden obtener los distintos tamaños de SiNPs [1]. Se procedió a la caracterización del nanomaterial

obtenido mediante microscopio electrónico de barrido (SEM), y microscopio electrónico de transmisión (TEM), con el objetivo de determinar su morfología y tamaño.

2.3 Bioensayos.

Para evaluar la toxicidad intrínseca de las SiNPs se emplearon tres metodologías diferentes: aplicación tópica; recubrimiento (coating) sobre vidrio, impregnación en papel filtro y espolvoreo sobre superficie de vidrio. Previo a su aplicación, las SiNPs se someten a sonicación por ultrasonido durante 15 min a 40 °C, utilizando acetona como solvente, con excepción del método de espolvoreo. Cada ensayo se realizó por triplicado, usando acetona como control negativo (sin efecto).

Para la aplicación tópica se emplea una microjeringa (Vol: 10 µl; Hamilton) para colocar una microgota dorsal con las distintas dosis de SiNPs, evaluando concentraciones de 10 a 50 mg/ml, sobre ninfas del 4^{to} y 5^{to} estadio. La mortalidad fue contabilizada luego de 1, 2, 7 y 14 días de la exposición para todas las técnicas ensayadas.

En las técnicas de recubrimiento (coating) sobre vidrio e impregnación en papel filtro, se aplicó un volumen de SiNPs de 1,5 ml y 0,7 ml, respectivamente. Se expusieron durante una hora a individuos adultos, preferentemente machos, para evitar que el comportamiento reproductivo (inseminación traumática) de esta especie pueda interferir en la mortalidad observada. Se evaluaron concentraciones de 10 a 100 mg/ml, aunque en algunas concentraciones se presentaron obstrucciones en la pipeta.

Por último, se evaluó el método de espolvoreo de las SiNPs sobre superficie de vidrio utilizando placas de Petri, y exposición de ninfas de 4^o y 5^o estadio. Los individuos caminan sobre la superficie tratada con una cantidad variable de SiNPs, durante un periodo de cuatro días. Las concentraciones evaluadas fueron de 0,5 a 6 mg/cm².

3. Resultados.

3.1 Síntesis de nanopartículas de sílice esféricas.

Como resultado de la caracterización de las nanopartículas sintetizadas (Fig.1) se evidenció que los tamaños no correspondieron con los descriptos en la bibliografía, ya que en promedio duplicaron el tamaño previsto. Por otro lado, en relación con la morfología, se observó bajo el microscopio electrónico de barrido (SEM) la forma esférica y de superficie lisa esperada. Los tamaños de las SiNPs de 18 nm presentaron un rango entre los 20 a 35 nm (Fig.1, A), mientras que las SiNPs de 60 nm presentan tamaños relativos de 89 a 170 nm (Fig.1, B), y las SiNPs de 108 nm, se observaron que sus tamaños relativos fueron cercanos a los 200 nm (Fig.1, C).

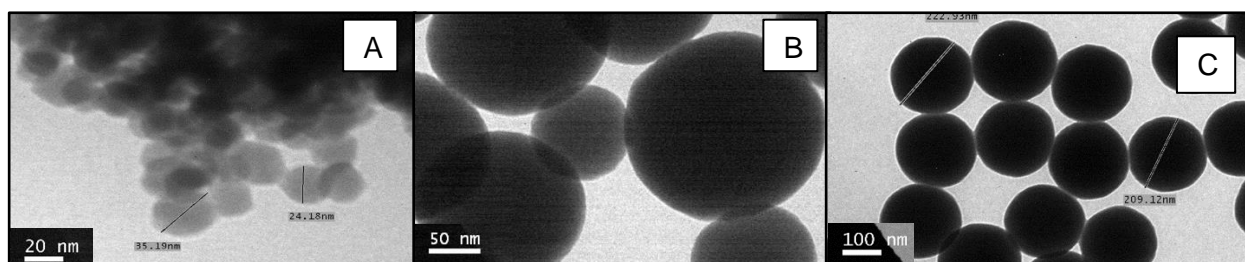


Fig. 1. Imágenes de SiNPs mediante TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión). A. SiNPs de 18 nm. B. SiNPs de 60 nm. C. SiNPs de 108 nm.

3.2 Bioensayos.

Los resultados para las nanopartículas de 20-35 nm, arrojaron una mortalidad del 0% mediante la aplicación tópica (n=40) y en la impregnación en papel (n=40), mientras que el recubrimiento en vidrio causó un 2.5% de mortalidad (n=30). En cambio, el espolvoreo en vidrio resultó en una mortalidad del 100% (n=90), indicando un efecto tóxico significativo con esta metodología.

Para el tamaño de nanopartícula de 89 a 170 nm, la mortalidad fue del 0% (n=20) en todas las metodologías evaluadas (aplicación tópica, recubrimiento en vidrio e impregnación en papel). Cabe destacar que no se realizó aún la evaluación del espolvoreo en vidrio para este tamaño de partículas.

Por último, para las nanopartículas de más de 200 nm, la aplicación tópica resultó en una mortalidad del 12.5% (n=40), mientras que el recubrimiento en vidrio (n=10) y la impregnación en papel (n=40) no mostraron efectos tóxicos, con una mortalidad del 0%. Al igual que en las nanopartículas de tamaño intermedio, la metodología de espolvoreo en vidrio aún no ha sido evaluada en este rango de tamaño.

4. Conclusión.

Se destaca que las nanopartículas de óxido de silicio esféricas de distinto tamaño y en resuspensión en acetona no causan mortalidad en chinches de cama. Sin embargo, se obtuvo mortalidad cuando se aplicó el método por espolvoreo en vidrio a las diferentes dosis evaluadas luego de 4 días de exposición continua.

Este análisis exhaustivo de las SiNPs se realizó con el objetivo de determinar la toxicidad intrínseca de los nanomateriales sintetizados en nuestro laboratorio. A partir de los ensayos realizados, podemos concluir que la elección apropiada de la metodología de aplicación de estas nanopartículas es fundamental para asegurar el efecto tóxico que se pretende observar.

Se continuará con más ensayos para explorar en mayor profundidad estos efectos y confirmar significativamente los resultados obtenidos.

Referencias Bibliográficas:

1. Thomassen, L. C., Aerts, A., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., ... & Martens, J. A. (2010). Synthesis and characterization of stable monodisperse silica nanoparticle sols for in vitro cytotoxicity testing. *Langmuir*, 26(1), 328-335.