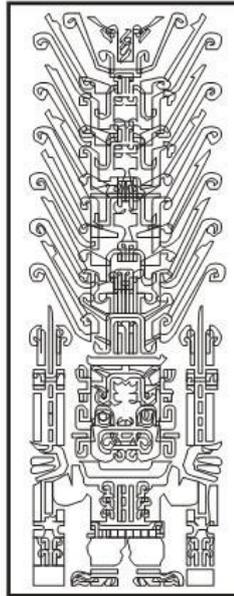


**UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EFFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DEL FULERENO C<sub>60</sub> A NIVEL  
MULTIGENERACIONAL EN *Daphnia magna* (CRUSTACEA:  
DAPHNIIDAE)**

**Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología**

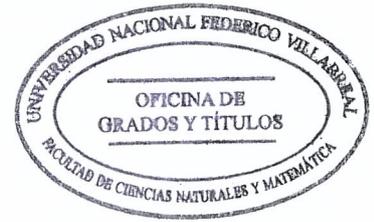
**LUIS MARCELO RAMOS VELÁSQUEZ**

**LIMA - PERÚ**

**2017**



*"Año del Buen Servicio al Ciudadano"*  
**OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS**



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la Sala de reuniones de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, siendo las <sup>14:00</sup> horas del día martes 21 de noviembre del 2017, de conformidad con el Artículo 45° acápite 45.2 de la Ley Universitaria 30220, Artículo 61° del Estatuto de la UNFV; acogiéndose a la obtención del Título Profesional, bajo la Modalidad de Sustentación de Tesis, presentado por el Bachiller en Biología, Sr.

### **RAMOS VELÁSQUEZ, Luis Marcelo**

Expuso la Tesis titulada:

#### **"EFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DEL FULERENO A NIVEL MULTIGENERACIONAL EN *Daphnia magna* (CRUSTACEA: DAPHNIIDAE)"**

Ante el Jurado Integrado por los siguientes Docentes:

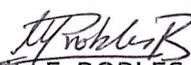
Mg. Margarita E. ROBLES ROMÁN	(PRESIDENTE)
Dr. José A. IANNAcone OLIVER	(SECRETARIO)
Lic. María C. TORRES SOSA	(MIEMBRO)
PhD. Álvaro MARCELO RODRÍGUEZ	(MIEMBRO)

Luego que el Jurado formulara las preguntas pertinentes y a las respuestas del Bachiller, se debatió libre y reservadamente declarándolo:

*Aprobado por Unanimidad*

En consecuencia se encuentra **APTO (X)**, **NO APTO ( )** para otorgársele el Título Profesional de **LICENCIADO EN BIOLOGÍA**; de conformidad con lo descrito firmamos:

  
Dr. José A. IANNAcone OLIVER  
SECRETARIO

  
Mg. Margarita E. ROBLES ROMÁN  
PRESIDENTE

  
Lic. María C. TORRES SOSA  
MIEMBRO

PhD. Álvaro MARCELO RODRÍGUEZ  
MIEMBRO

*A mi familia, ellos son todo para mí.*

*“Ha sido todo un viaje, creo que he tenido que estar en ese lugar, para estar en el que estoy. Ahora algunos de ustedes pueden seguir en ese lugar, si están tratando de salir, solo síganme, los sacaré de allí”*  
**MARSHALL MATHERS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primero a Dios, espero que sea como el Dios de Spinoza que mencionaba el gran Albert Einstein, al destino que me pusieron en esta carrera en estos tiempos y circunstancias para poder haber pasado todo lo que tuve que pasar para llegar hasta aquí.

Quiero agradecer a mi familia, mis padres que siempre me apoyaron en todo, soportaron mis días y noches incomodando con mis trabajos, horarios disparatados y peticiones hasta ridículas, con tal de llegar a aprobar un curso. Mi padre es un gran ejemplo de perseverancia y querer hacer bien las cosas, mi madre es un ejemplo de firmeza ante cualquier circunstancia, y mi hermano es quien quiero que me supere y sea mucho mejor de lo que seré. También a toda la familia Ramos – Velásquez conformada por mis primos, tíos y abuelos que de una forma u otra me han ayudado a ser mejor. Agradezco a mis grandes amigos: Edgard, Johanna, David, entre otros, gracias a ellos pude divertirme, ser feliz, y hasta ahora sigo con ellos y estamos para apoyarnos siempre en todo.

También agradezco a mis compañeros de la Universidad Federico Villarreal, por todas las risas, sufrimientos, amanecidas, peleas, y todo lo que hemos pasado para culminar nuestras carreras y encontrarnos en el camino de un profesional. Se aprende siempre de con quien uno prácticamente ha convivido

por 5 largos años, pero divertidos. Asimismo a mis profesores que fueron parte en mi formación profesional.

Agradezco al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Universidad Cayetano Heredia, donde hice mi tesis en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, donde la Dra. Rafaela Elias-Letts confió en mí y en la propuesta de mi investigación donde me dieron muchas facilidades. El grupo humano fue muy amable con gente muy profesional como el Dr. Raúl Loayza Muro, y compañeros muy gentiles como Silvia, Paola, Carla, Nadia, Bruno, y todos los que me dieron una mano, aun viniendo de otra universidad.

Agradezco a Ecogestión Consultores, quienes me dieron la primera oportunidad de ser profesional, soportaron mi ausencia mientras avanzaba mis investigaciones conocí personas muy admirables, en especial a Gabriela, alguien que me demostró que los sueños existen en cada uno de nosotros, y me hizo tomar importantes decisiones en este camino, ahora no tengo sueños, los convertí en metas.

Espero que no se me haya escapado alguien sino, dedico todos mis más sinceros agradecimientos, y recalcar que este es solo un peldaño de mi carrera profesional. El camino es largo y a pesar que soy una persona que se caracteriza por trabajar solo, siempre tendré a muchas personas a quien agradecer en esta vida.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>36</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>23</b>
<b>1.1. Generalidades</b>	<b>23</b>
1.1.1. Ecotoxicología	23
1.1.2. Características de los Ensayos de toxicidad	23
1.1.3. Tipos de Ensayos y Parámetros Evaluados	23
1.1.3.1. Mortalidad	24
1.1.3.2. Saltos como respuesta a contaminantes	24
1.1.3.3. Estrés Oxidativo en ecotoxicología	25
<b>1.2. <i>Daphnia magna</i></b>	<b>27</b>
1.2.1. Morfología y Fisiología	28
1.2.2. Reproducción	30
1.2.3. Importancia en ensayos de ecotoxicológicos.	32
<b>1.4. Fullerenos</b>	<b>36</b>
1.4.1. Propiedades físicas y químicas del fullereno	37
1.4.2. Efectos tóxicos del fullereno	38
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>2.2. Preparación del medio de cultivo y soluciones de fullereno</b>	<b>43</b>
2.2.1. Preparación del medio de cultivo para <i>Daphnia magna</i>	43
2.2.2. Preparación de soluciones de fullereno	43
<b>2.3. Ensayos de Toxicidad Aguda</b>	<b>44</b>
2.3.1. Capacidad Antioxidante (Modificado de Brand-Williams <i>et al.</i> , 1995)	45

<b>2.4.</b>	<b>Ensayos de Toxicidad Crónica</b>	<b>45</b>
2.4.1.	Determinación de Proteínas totales	46
2.4.2.	Evaluación de Actividad Enzimática de Catalasa (Modificado de Aebi, 1974)	47
2.4.3.	Evaluación de Actividad Enzimática de Superóxido dismutasa (SOD, Modificado de Misra y Fridovich, 1972)	47
2.4.4.	Tasa Intrínseca de Reproducción	48
<b>2.5.</b>	<b>Procedimientos de análisis de datos</b>	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b>3.1.</b>	<b>Ensayos de Toxicidad Aguda</b>	<b>50</b>
3.1.1.	Ensayos previos	50
3.1.2.	Mortalidad y Determinación de la CL <sub>50</sub>	50
3.1.3.	Frecuencia de saltos	51
3.1.4.	Capacidad Antioxidante	52
<b>3.2.</b>	<b>Ensayos de Toxicidad Crónica Multigeneracional</b>	<b>53</b>
3.2.1.	Tallas y pesos	54
3.2.2.	Tasa de Reproducción	56
3.2.3.	Actividad enzimática de Catalasa	58
3.2.4.	Actividad enzimática de Superóxido Dismutasa	59
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ensayos de Toxicidad Aguda</b>	<b>61</b>
4.1.1.	Mortalidad y CL <sub>50</sub>	61
4.1.2.	Respuestas mediante Frecuencia de Saltos	62
4.1.3.	Capacidad Antioxidante	63

<b>4.2. Ensayos de Toxicidad Crónica Multigeneracional</b>	<b>64</b>
4.2.1. Tallas y Pesos	64
4.2.2. Actividad Enzimática	67
4.2.3. Tasa Intrínseca de Reproducción	74
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>78</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>80</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>82</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>106</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Producción promedio mundial de diez nanomateriales en toneladas</b>	<b>34</b>
---	-----------

<b>Tabla 2. Efectos del fullereno reportados en <i>Daphnia magna</i></b>	<b>39</b>
--	-----------

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Esquema de la formación y eliminación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) y las enzimas antioxidantes envueltas en estos procesos.</b>	
.....	<b>27</b>
<b>Figura 2. <i>Daphnia magna</i> vista en forma ampliada bajo un microscopio óptico.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3. Morfología de <i>Daphnia magna</i> hembra.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Ciclo de vida de <i>Daphnia</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 5. Escala de algunos nanomateriales encontrados en un rango de 1 – 100 nm.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 6. Estructura del fullereno.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 7. Esquema de trabajo.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 8. Gráfica de Concentración de Fullereno C<sub>60</sub> vs. Mortalidad de <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>51</b>

<b>Figura 9. Gráfica de Concentración de Fullereno C<sub>60</sub> vs. Frecuencia de saltos en <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 10. Gráfica de Concentración de Fullereno C<sub>60</sub> vs. Capacidad Antioxidante (% de Captación de Radicales Libres).....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 11. Longitudes promedio (cm) de <i>Daphnia magna</i> a través de tres generaciones en tratamiento con fullereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 12. Pesos promedio (mg) de <i>Daphnia magna</i> a través de tres generaciones en tratamiento con fullereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento alguno.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 13. Pesos promedio (mg) de <i>Daphnia magna</i> a través de tres generaciones en tratamiento con fullereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento alguno.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 14. . Valores promedio actividad enzimática de Catalasa de <i>Daphnia magna</i> (U CAT/mg proteínas) a través de tres generaciones en tratamiento con fullereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento.....</b>	<b>59</b>

**Figura 15. Valores promedio actividad enzimática de Superóxido Dismutasa de *Daphnia magna* (U SOD/mg proteínas) a través de tres generaciones en tratamiento con fulereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento.....60**

**Figura 16. Funciones del programa PROBIT de la US.EPA e introducción de datos en los controles.....111**

**Figura 17. Introducción de datos de respuesta en las concentraciones y confirmación.....111**

**Figura 18. Resultados obtenidos con PROBIT 1.5.....112**

## INDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1. Instalación de los medios de cultivo de <i>Daphnia magna</i> en el laboratorio.....</b>	<b>107</b>
<b>Fotografía 2. Instalación de ensayos de toxicidad en el laboratorio.....</b>	<b>107</b>
<b>Fotografía 3. Filtrado de soluciones del Fullereno C<sub>60</sub> luego de pasar por el proceso de agitación.....</b>	<b>108</b>
<b>Fotografía 4. Almacenamiento final de soluciones de fullereno en frascos ámbar para evitar su contacto con la luz.....</b>	<b>108</b>
<b>Fotografía 5. <i>Daphnia magna</i> en ensayo de toxicidad por fullereno C<sub>60</sub> a 48 h. Control negativo.....</b>	<b>109</b>
<b>Fotografía 6. <i>Daphnia magna</i> en exposición al fullereno C<sub>60</sub> a 48 h a una concentración de 50 mg/L.....</b>	<b>109</b>
<b>Fotografía 7. <i>Daphnia magna</i> en exposición al fullereno C<sub>60</sub> a 48 h a una concentración de 80 mg/L.....</b>	<b>109</b>

<b>Fotografía 8. <i>Daphnia magna</i> en exposición al fullereno C<sub>60</sub> a 48 h a una concentración de 150 mg/L.....</b>	<b>109</b>
<b>Fotografía 9. Ensayo de toxicidad crónico de fullereno C<sub>60</sub> en <i>Daphnia magna</i>. F<sub>0</sub> Control.....</b>	<b>110</b>
<b>Fotografía 10. Ensayo de toxicidad crónico de fullereno C<sub>60</sub> en <i>Daphnia magna</i>. F<sub>0</sub> con Tratamiento. ....</b>	<b>110</b>
<b>Fotografía 11. Ensayo de toxicidad crónico de fullereno C<sub>60</sub> en <i>Daphnia magna</i>. F<sub>1</sub> Control.....</b>	<b>110</b>
<b>Fotografía 12. Ensayo de toxicidad crónico de fullereno C<sub>60</sub> en <i>Daphnia magna</i>. F<sub>1</sub> con Tratamiento. ....</b>	<b>110</b>
<b>Fotografía 13. Ensayo de toxicidad crónico de fullereno C<sub>60</sub> en <i>Daphnia magna</i>. F<sub>2</sub> Control.....</b>	<b>110</b>
<b>Fotografía 14. Ensayo de toxicidad crónico de fullereno C<sub>60</sub> en <i>Daphnia magna</i>. F<sub>2</sub> con Tratamiento. ....</b>	<b>110</b>

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1: REPORTE FOTOGRÁFICO.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO 2: RESULTADOS OBTENIDOS POR SOFTWARE PROBIT 1.5.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO 3: RESULTADOS OBTENIDOS POR SOFTWARE SPSS 24.....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO 4: HOJA DE SEGURIDAD DEL FULLERENO.....</b>	<b>121</b>

## RESUMEN

Existen muchas preguntas sin contestar sobre los impactos de a nanotecnología en la salud y el ambiente. El fullereno C<sub>60</sub> es uno de los nanocompuestos que ha tenido una gran diversidad de aplicaciones en los últimos años. Posee una característica de ser insoluble en agua, sin embargo, puede formar coloides en agregados cristaloides, los cuales se mantienen en el tiempo en compartimientos acuáticos. El objetivo del presente estudio fue evaluar los impactos del fullereno en ecosistemas acuáticos a nivel agudo y crónico del tipo multigeneracional. Para esto se utilizó a *Daphnia magna* evaluando tres escalas de respuesta: a nivel agudo la supervivencia calculando la CL<sub>50</sub>, la frecuencia de santos y la determinación de la capacidad antioxidante, mientras que a nivel crónico por 14 días en tres generaciones sucesivas se evaluaron parámetros morfológicos como talla y peso, la actividad enzimática de la Catalasa (CAT) y Superóxido Dismutasa (SOD), y la Tasa intrínseca de reproducción ( $r$ ). Los resultados reportan a 48 h una CL<sub>50</sub> de 81.95 mg/L, un CL<sub>10</sub> de 21.27 mg/L y una correlación positiva entre las concentraciones y los criterios evaluados a nivel agudo. A nivel crónico se reportó incrementos en las actividades enzimáticas, especialmente la SOD, y un bajo incremento de la tasa intrínseca de reproducción ( $p < 0.05$ ), mientras que las tallas y pesos no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Esto nos sugiere que mientras que a nivel agudo la capacidad antioxidante es un buen parámetro de medición de efectos del fullereno ( $r^2 = 0.97$ ), la actividad enzimática de SOD y la tasa intrínseca de reproducción son los parámetros

más relevantes en este tipo de evaluación de estrés tóxico por fullereno C<sub>60</sub> a nivel crónico por generaciones.

**Palabras clave:** Nanocompuestos, fullereno, *Daphnia magna*, multigeneracional.

## ABSTRACT

There are many unanswered questions about the impacts of nanotechnology on health and the environment. Fullerene C<sub>60</sub> is a type of nanocomposite that has had a great diversity of applications in recent years. It has a characteristic of being insoluble in water, however, it can form colloids in crystalloid aggregates, being able to be maintained in the time in aquatic compartments. The objective of the present study was to evaluate the impacts of fullerene on aquatic ecosystems at the acute and chronic level of the multigenerational type. For this, *Daphnia magna* was evaluated by evaluating three response scales: acute survival by calculating the LC<sub>50</sub>, hop frequency and the determination of antioxidant capacity, whereas at a chronic level for 14 days in three successive generations, morphological parameters such as height and weight, Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD) enzymatic activity, and finally the calculation of Intrinsic rate of reproduction ( $r$ ). The results reported at 48 h a LC<sub>50</sub> of 81.95 mg/L, a LC<sub>10</sub> of 21.27 mg/L and a positive correlation between the concentrations and the criteria evaluated at the acute level. Increases in enzyme activities, especially SOD, and a low increase in intrinsic rate of reproduction ( $p < 0.05$ ) were reported at a chronic level, while sizes and weights did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). This suggests that while at the acute level the antioxidant capacity is a good parameter of measurement of effects of fullerene ( $r^2 = 0.97$ ), SOD activity and intrinsic rate of reproduction are the most relevant parameters in this type of evaluation of Toxic stress by fullerene C<sub>60</sub> in chronic level for generations.

**Keywords:** Nanocomposites, fullerene, *Daphnia magna*, multigenerational.

## INTRODUCCIÓN

La nanotecnología se ha desarrollado de manera muy avanzada en el mundo a nivel de muchas industrias. Estos avances han servido mucho en aplicaciones específicas como la medicina, cosmética, electrónica o farmacéutica (Colvin, 2003). Dal Forno *et al.* (2013) menciona a la nanotoxicología como una ciencia emergente, la cual tiene la misión de resolver ciertas carencias de información sobre los efectos que puedan tener los compuestos generados por estas recientes tecnologías que vienen aumentando con el pasar de los años. Además de ello, el fullereno es el nanocompuesto que manifestado un mayor crecimiento en estos tiempos; de esa forma, se requiere una investigación más profunda sobre su destino en los compartimientos ambientales y los impactos que pueda generar (Avanasi *et al.*, 2014).

Los estudios hechos sobre el fullereno en diferentes tipos de especies, han registrados niveles de toxicidad, mencionando en un caso específico a *Daphnia magna* (Oberdöster 2004b; Fortner *et al.*, 2005 y Lovern y Klaper, 2006). Sin embargo, se ha determinado que en la mayoría de los casos evaluados la toxicidad del fullereno se ha visto incrementada debido al tipo de solvente utilizado en los ensayos, siendo el Tetrahidrofurano (THF) el más utilizado (Henry *et al.*, 2007).

Estudios de efectos del fulereno se han encontrado a nivel multigeneracional realizados por Ardnt (2014). Estos compuestos han sido complejos derivados del fulereno, siendo este un primer avance de cómo estos compuestos pueden afectar a generaciones futuras teniendo una mayor implicancia en su respectivo riesgo ambiental.

Esto nos muestra que en la actualidad se han reportado trabajos realizados del fulereno a un nivel agudo de toxicidad en organismos acuáticos. *Daphnia magna* es un organismo muy utilizado para ensayos de ecotoxicología, siendo los ensayos crónicos los que mayor parámetros nos dan respuesta a un nivel más profundo como son: comportamiento, tasas de alimentación y filtración, respiración, crecimiento somático, crecimiento poblacional, demografía de la tabla de vida, bioacumulación, trabajos bioquímicos y moleculares, entre otros (Sarma & Nandini, 2006).

Los parámetros utilizados en ecotoxicología (*endpoints*) son básicos para el crecimiento de una población o comunidad, sin embargo, han sido criticados de carecer importancia ecológica. Hammers-Wirtz y Raze (2000) afirmaron que la tasa de crecimiento de una población ( $r$ ) se puede utilizar para evaluación de riesgos. Otros parámetros que han sido utilizados en los últimos años para estas evaluaciones han sido los biomarcadores (Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo, 2011; Ardnt, 2014) los cuales han mostrado resultados favorables de los efectos de contaminantes en organismos acuáticos.

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el efecto ecotoxicológico a nivel multigeneracional en los aspectos comportamental, bioquímico y reproductivo en la *Daphnia magna* en exposición al Fulereo C60 en sistemas acuáticos.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Generalidades

#### 1.1.1. Ecotoxicología

El término ecotoxicología fue introducido por Truhaut en 1969, el cual fue derivado de las palabras ecología y toxicología. Esto se refiere a los efectos que puedan tener los químicos destinados en el ambiente en organismos que no sean los humanos. Mientras que la toxicología ambiental como rama de la toxicología se ha enfocado mucho en los humanos, la ecotoxicología, es una disciplina dentro de este amplio campo de la toxicología (Walker *et al.*, 2012).

#### 1.1.2. Características de los Ensayos de toxicidad

- Ecológicamente significativos
- Presenten información que se defiende desde el punto de vista científico y legal.
- Predigan efectos ecológicos
- Simples y de costo efectivo.

Estas características fueron discutidas en los años 70' y se han mantenido hasta la actualidad como base para definir este tipo de estudios (Ramírez y Mendoza, 2008).

#### 1.1.3. Tipos de Ensayos y Parámetros Evaluados

En los ensayos de **toxicidad aguda**, los principales factores a considerar son la especie de ensayo, la edad de la población de ensayo y la duración experimental, siendo el principal parámetro o *endpoint* a evaluar es la

mortalidad de los organismos utilizados para los experimentos. Los ensayos de **toxicidad crónica** consideran diferentes aspectos: comportamiento (por ejemplo, migración vertical), tasas de alimentación y filtración, respiración, crecimiento somático, crecimiento poblacional (tasa de reproducción), demografía de la tabla de vida, bioacumulación, trabajos bioquímicos y moleculares relacionados (Sarma y Nandini, 2006).

#### **1.1.3.1. Mortalidad**

En los ensayos de ecotoxicología se determinan los efectos de los contaminantes sobre los organismos o comunidades, de esta manera, se puede juzgar el riesgo ecológico de dicho compuesto. Para este propósito se utilizan respuestas de bioensayos como la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) (Iannacone y Alvarino, 2002), donde este parámetro indica la población estimada a la cual se produjo el 50% de muerte durante un ensayo de toxicidad (González y Aportela, 2001).

#### **1.1.3.2. Saltos como respuesta a contaminantes**

*Daphnia* es un organismo acuático que tiene la particularidad de poseer una rápida respuesta de evasión a los contaminantes que puede ser comparada con muchos de los *endpoints* habitualmente utilizados en ecotoxicología (Lopes *et al.*, 2004). Este tipo de evasión se manifiesta el tipo de nado o por saltos a manera de comportamiento en trabajos realizados (Lovern *et al.*, 2007, Tao *et al.*, 2009), Sin embargo, el comportamiento del nado o saltos en

este género puede ser un tipo de interacción con sus predadores, debido al movimiento en los cuerpos de agua que estos realizan, facilitando su detección y captura (Gorski & Dodson, 1996).

### **1.1.3.3. Estrés Oxidativo en ecotoxicología**

El término de estrés oxidativo se refiere a un desequilibrio entre la producción excesiva o la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y a un mecanismo antioxidante deteriorado (Sikka, 2001). El interés en este tipo de respuestas en el campo ecotoxicológico se encuentra basado en la "paradoja del oxígeno", debido a que el oxígeno es importante para las funciones celulares es organismos aeróbicos, pero las ERO's se forman como una consecuencia de este consumo (Regoli *et al*, 2002).

#### **a. Radicales libres**

Los radicales libres son especies químicas capaces de tener una existencia independiente que contienen uno o más electrones no apareados (Halliwell y Gutteridge, 1999). Muchos de estos radicales son producidos en las mitocondrias celulares como producto del transporte de electrones, y su acumulación en el organismo se encuentra relacionado a muchos desórdenes metabólicos como diabetes, artritis, enfermedades nerviosas entre otros (Pattanaik *et al.*, 2003). En el caso de los organismos acuáticos, diariamente reciben cantidades de contaminantes que causan estrés oxidativo mediante la formación los radicales libres y las ERO's (Bhat, 2013).

Los principales radicales libres de oxígeno son el oxígeno atómico singlete, radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Andrade *et al.*, 2005). La Enzima Superóxido Dismutasa (SOD) es responsable de la remoción de los radicales libres de oxígeno formados ( $\text{O}_2^-$ ), mediante su conversión a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual es hidrolizado a agua y oxígeno con la ayuda de las enzimas Catalasa y Glutación Peroxidasa (Pattanaik *et al.*, 2003).

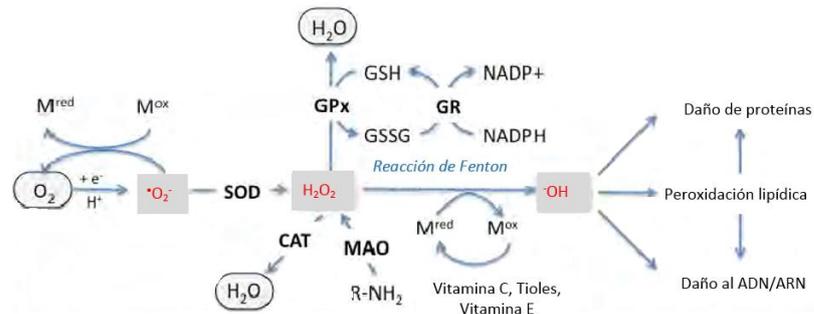
#### **b. Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)**

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que fue aislada en los años 30' por Mann y Kellin, pero su función catalítica fue descubierta por McCord y Fridovich en 1969. Todas estas enzimas tienen la función de captar el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y convertirlo en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Existen varios tipos de esta enzima de acuerdo al cofactor presente, siendo el MnSOD uno de los más importantes ya que su rol se ha mantenido en muchos organismos (Scandalios, 1993).

#### **c. Catalasas (EC 1.11.1.6)**

Las catalasas (CAT) son enzimas que son capaces de descomponer  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  a cualquier pH entre 4 y 11. Junto con las Peroxidasas cumplen esta importante función, y se diferencian de las segundas ya que las peroxidasas emplean un sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las Catalasas emplean dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , una como agente reductor y otra como agente

oxidante, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  al entrar al sitio activo de la enzima, toma un electrón del Hierro y otro de uno de sus grupos hemo para generar una molécula de agua, una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de dióxigeno y agua (Hangsber, 2002).



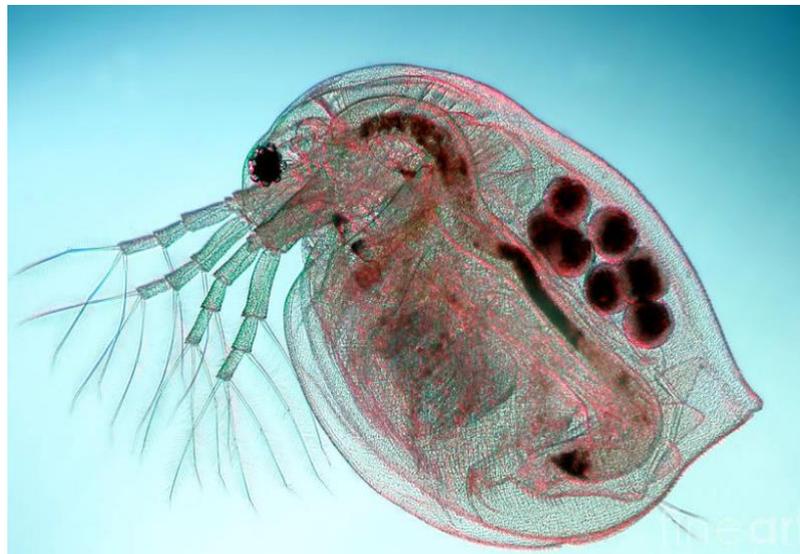
**Figura 1.** Esquema de la formación y eliminación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) y las enzimas antioxidantes envueltas en estos procesos, siendo la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) las que se ubican en los primeros niveles de defensa antioxidante (De la Monte, 2011).

## 1.2. *Daphnia magna*

- Phylum: Arthropoda
- Subphylum: Crustacea
- Clase: Brachiopoda
- Orden: Diplostraca
- Suborden: Cladocera
- Familia: Daphniidae
- Género: *Daphnia*
- Especie: *D. magna*

*Daphnia magna* es un crustáceo de amplia distribución mundial (Villarroel,

2004). Se pueden encontrar en lugares situados a bajas y alturas medias sobre el nivel del mar, por lo general en donde se perciben climas áridos. Estos individuos tienen preferencia por aguas de volúmenes pequeños como zanjas, charcas o lagunas, donde existe poca turbidez y expuestas a la radiación solar; además de encontrarse en zonas litorales o ambientes donde abunda la vegetación, en donde forman comunidades llamadas enjambres (Alonso, 1996).



**Figura 2.** *Daphnia magna* vista en forma ampliada bajo un microscopio óptico.  
Fuente: <http://www.fineartamerica.com/>

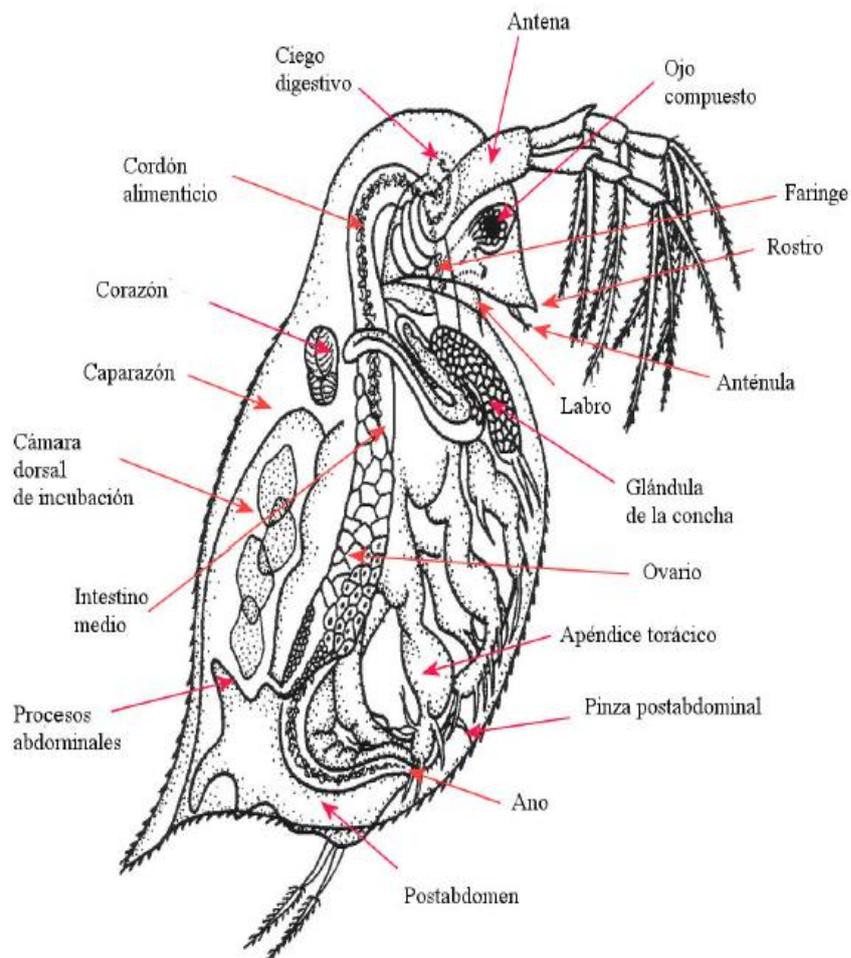
### 1.2.1. Morfología y Fisiología

*Daphnia magna* es un crustáceo acuático que mide una longitud que puede alcanzar los 6mm en su estadio adulto, con tiempo de vida media de 40 días a 25°C (Valdés, 2009). Su cuerpo se encuentra segmentado de manera poco evidente tres regiones (Céfaleon, péreon y pleon). Poseen un caparazón bivalvo comprimido de forma lateral que cubre el cuerpo a excepción de la

parte cefálica, además de una cámara en la sección dorsal siendo de importancia en la reproducción asexual en el almacenamiento de embriones y en la sexual para la recepción del postabdómen de los machos (Sánchez, 2006).

*Daphnia* también posee un aparato filtrante conformado por sus piernas o apéndices llamados filópodos (Dieter, 2005). El resto del cuerpo está conformado por las antenas y antenulas, las cuales son importantes en los desplazamientos por "saltos" (de allí que su nombre común es pulga de agua) (Waterman, 1961). En el caso de su sistema sensorial poseen un ojo compuesto (Ruppert y Barnes, 1996).

Su alimento es atrapado por sus filópodos conformando su aparato filtrante, alimentándose principalmente de algas en los cuerpos de agua donde habitan. Poseen una circulación abierta y utilizan la Hemoglobina como su transportador de oxígeno, y unas glándulas que absorben iones en su sistema de osmorregulación (Dieter, 2005).

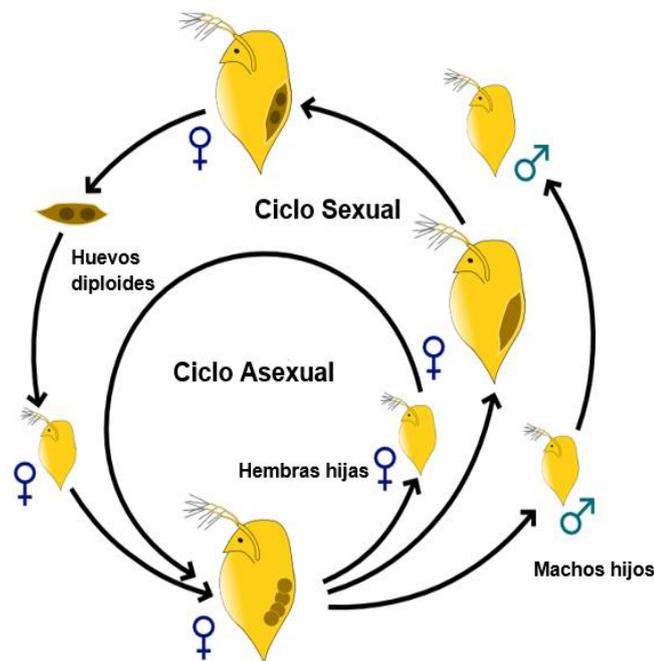


**Figura 3.** Morfología de *Daphnia magna* hembra (Sánchez, 2006).

### 1.2.2. Reproducción

**Reproducción Asexual:** *Daphnia* es un género caracterizado por ser por lo general individuos hembras partenogenéticas, esto se produce en condiciones favorables para estos dáfnidos, y las hembras contienen embriones en tres estadios diferentes de desarrollo. Los neonatos son liberados de la cámara de incubación de las hembras junto con el desprendimiento del exoesqueleto del parental, dando como resultado hembras con características morfológicas similares a la del adulto (Sánchez, 2006).

**Reproducción sexual:** Casi en su totalidad las poblaciones de *Daphnia* se encuentran conformadas por hembras. Sin embargo, ciertos factores como la temperatura del medio o un descenso en la disponibilidad de alimento, se induce a la aparición de machos y debido a ello, la reproducción sexual (Villarreal, 2004). Los huevos se encuentran cubiertos por un caparazón denominado **epifia**, las cuales se adaptan a las condiciones a malas condiciones y requieren menor inversión metabólica y al regresar nuevamente las condiciones favorables, las epifias dan lugar a hembras partenogenéticas que volverán a formar el ciclo asexual (Ruppert y Barnes, 1996).



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Daphnia*. Se pueden apreciar ambas etapas, donde en la asexual se forman clones hembras, mientras que en el ciclo sexual intervienen los machos haploides para formar huevos diploides.

Fuente: <http://sustainablenano.files.wordpress.com/2013/06/daphnia-reproductive-cycles.png>

### **1.2.3. Importancia en ensayos de ecotoxicológicos.**

*Daphnia magna* es un organismo utilizado en ensayos de Ecotoxicología a manera de indicador, y en base a esta especie se han determinado una serie de puntos finales o *endpoints* que son utilizados como parámetros ecotoxicológicos en la evaluación de riesgo por muchas instituciones como la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD), Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US.EPA) y la Asociación Americana de Salud Pública (APHA).

Es por ello que sus aplicaciones han sido llevadas en una infinidad de estudios en los cuales se han reportado efectos letales de contaminantes en estos organismos (Núñez y Hurtado, 2005; Iannacone y Alvarino, 2007; Gaete y Chávez, 2008), respuestas a nivel de biomarcadores (Coen y Jansen, 1998; Fan *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011), efectos multigeneracionales (Sánchez, 2006; Völker *et al.*, 2013), reproductivos (Kashian y Dodson, 2002; Manar *et al.*, 2009), e inclusive estudios *in vivo* (Coen *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2007) e *in situ* (Barata *et al.*, 2007; Damásio *et al.*, 2008), para las evaluaciones de riesgo ambiental.

### **1.3. Nanopartículas y Nanomateriales**

Las nanopartículas han sido clasificadas dentro del grupo de los nanomateriales cuyas dimensiones se encuentran entre 1 y 100 nm, y siempre han existido en el ambiente, sean de fuente natural o antropogénica (Klaine *et al.*, 2008). Con el avance de la nanotecnología ha tenido como consecuencia

la amplia producción y usos de los nanomateriales y nanopartículas. La estimación de la producción global de estos compuestos se pueden apreciar en la Tabla 1 (Piccinno *et al.*, 2012). De esta data se puede apreciar que las nanopartículas de SiO<sub>2</sub> se producen en mayor volumen, además, las nanopartículas de plata son las más usadas en productos de consumo debido a las excelentes propiedades de la plata como conductor de metales, poseen propiedades químicas y físicas como la biocompatibilidad, que les permite tener una amplia variedad de aplicaciones como el caso de la medicina antimicrobiana o transporte de electrones a través de biomoléculas (Bondarenko *et al.*, 2013). El fullereno tiene una baja producción anual en comparación con otros nanomateriales, sin embargo, su producción ha crecido de manera exponencial en la década pasada (Vásquez, 2014) y su estimación de producción continuará aumentando conforme las aplicaciones sean de mayor utilidad a las personas.

Este incremento de producción no solo del fullereno, sino del resto de nanomateriales ha conllevado a su vez las interrogantes sobre su destino final de estos compuestos luego de su producción y utilización a nivel doméstico e industrial, y por ende, se relaciona a la liberación indebida en los compartimientos ambientales (Gao *et al.*, 2009).

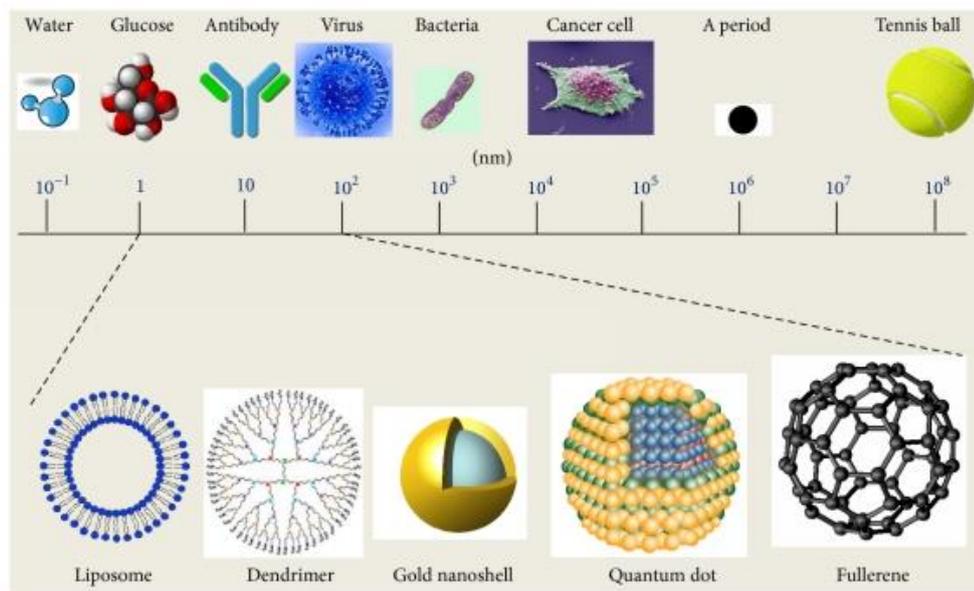
**Tabla 1.** Producción promedio mundial de diez nanomateriales en toneladas por año (Piccino *et al.*, 2012).

Nanomaterial	Producción mundial promedio (t/año)	Producción Europea promedio (t/año)	Estados Unidos (t/año) (Año 2011) – Rango
TiO <sub>2</sub>	3000	550	7800 – 38000
ZnO	550	55	
SiO <sub>2</sub>	5500	5500	
FeO <sub>x</sub>	55	550	
AlO <sub>x</sub>	55	550	
CeO <sub>x</sub>	55	55	35-700
Nanotubos de Carbono (CNT)	300	550	55-1101
Fulerenos	0.6	0.6	2-80
Nanomateriales de Plata	55	5.5	2.8 - 20
Puntos Cuánticos	0.6	0.6	

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA, 2007), los nanomateriales han sido clasificados en cuatro grandes grupos:

- a. **Materiales compuestos de Carbono:** Siendo el carbono el elemento que forma la mayor parte de su composición, pueden adoptar muchas formas, desde esferas, tubos o elipsoides. El fulereno se encuentra dentro de este grupo.
  
- b. **Materiales compuestos de metales:** contienen metales como el nano-oro, nano-plata y óxidos de metal (como el dióxido de titanio).

- c. **Dendrimeros:** Son polímeros de tamaño muy pequeño, compuestos de muchas unidades adjuntas. La superficie de ellos tienen numerosas cadenas terminales, y estas determinan sus funciones químicas.
- d. **Compositos:** Estos son combinaciones entre nanopartículas o con otros materiales más grandes. Un ejemplo son las nanoarcillas.



**Figura 5.** Escala de algunos nanomateriales encontrados en un rango de 1 – 100 nm. (Pradhan *et al.*, 2015).

La exposición de estas partículas ha sido experimentada por los humanos, pero solo con la llegada de la revolución industrial estas exposiciones se han incrementado. El campo de la nanotecnología es una de las principales fuentes de exposición de diferentes rutas como la inhalación, ingestión, dérmica y a través del torrente sanguíneo (Obertdoster *et al.*, 2005).

Debido al incremento de la nanotecnología, y a los posibles riesgos a nivel de la salud y ambiental que puedan generarse, apareció la nanotoxicología para poder evaluar los efectos que puedan ocasionar al ser liberados al ambiente (Avanasi *et al.*, 2014).

#### **1.4. Fulereo**

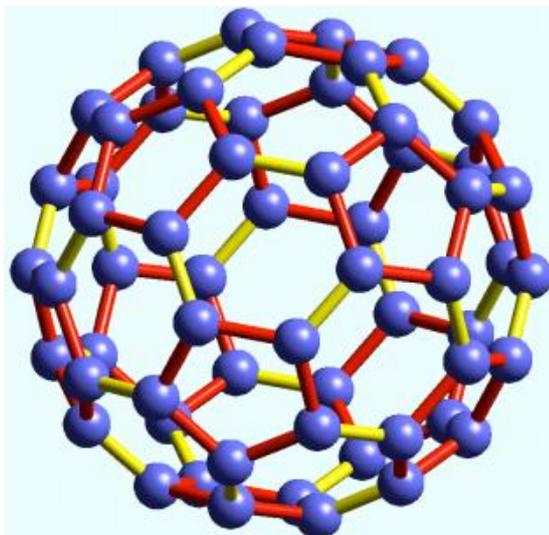
El fulereo de carbono, también denominado C<sub>60</sub> o Fulereo Buckminster (La estructura fue construida por Buckminster Fuller), fue descubierto por Kroto en 1985, en el cual se describen 60 átomos de carbono que se encuentran enlazados en un icosaedro de alta estabilidad, este complejo consiste de 60 vértices y 32 caras y un diámetro aproximado de 1nm (Kroto *et al.* 1985).

En la actualidad el uso del fulereo se ha debido a su estructura única y a sus aplicaciones potenciales en la industria, medicina, entre otros (Tervonen, 2010). Estas aplicaciones, principalmente industriales, ha conllevado a su liberación en el ambiente (Fortner *et al.*, 2005).

La problemática acerca de este compuesto a nivel ambiental es sus posibles efectos tóxicos en organismos vivos. Esto ha sido materia de discusión al revelarse que el fulereo es capaz de atravesar la membrana celular y ser detectado en estructuras como el citoplasma, mitocondrias y el núcleo celular (Vásquez, 2014).

Con respecto a la legislación sobre su fabricación y usos no hay una

regulación fijada en la actualidad, y solo se ha registrado al fullereno en hojas de seguridad basadas en carbón negro (Fortner *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Estructura del fullereno (Ulloa, 2013)

En el caso de los compartimientos ambientales acuáticos, pueden ser vulnerables debido a la posible solubilidad del fullereno con otros componentes en los efluentes industriales, estos pudiendo afectar a los miembros del zooplancton y los invertebrados que son consumidores de elementos pequeños como estos nanocompuestos, y sus posibles efectos en las cadenas tróficas aun es desconocido (Vásquez, 2014).

#### **1.4.1. Propiedades físicas y químicas del fullereno**

Las propiedades físicas del fullereno se basan en la estructura de un icosaedro, ya que son moléculas muy resistentes. Poseen una densidad de  $1.65 \text{ g/cm}^3$ . Punto de ebullición a  $800^\circ\text{K}$ , un índice de refracción de 2.2 (600

nm), una baja solubilidad de agua y una forma en su estructura similar a una pelota de fútbol soccer (Yadav y Kumer, 2008).

En cuanto a la química del fulereno, los átomos de carbono se encuentran hibridizados en  $sp^2$  y  $sp^3$ , de los cuales los carbonos  $sp^2$  son los responsables de la tensión en los ángulos dentro de la molécula.  $C_{60}$  y  $C_{70}$  muestran la capacidad de reducirse de forma reversible con un máximo de seis electrones, mientras que la oxidación es irreversible (Ulloa, 2013).

#### **1.4.2. Efectos tóxicos del fulereno**

- Genotoxicidad en soluciones acuosas y de etanol de fulereno en linfocitos humanos (Dhawan *et al.*, 2006) y en *Salmonella typhimurium*, aunque en este último caso, el daño al material genético fue producido en presencia de luz y mediante la aparición de especies reactivas de oxígeno.
- Modificación en la regulación génica usando soluciones hidroxiladas de fulereno en embriones de peces cebra *Dania rerio* (Jonanovic, 2011).
- Acumulación y depuración del fulereno en *Daphnia magna* siendo perjudicial tanto en las cadenas tróficas y en el sedimento (Tervonen *et al.*, 2010).
- Fujita *et al.* (2009) hizo ensayos de inhalación de fulereno  $C_{60}$  en ratas, y se detectó que existió una regulación pequeña de genes envueltos en la estimulación de inflamación, estrés oxidativo y apoptosis, aunque los daños reportados en células epiteliales o macrófagos no fueron de gran magnitud.

- Kamat *et al.* (2000) reportó peroxidación lipídica y daño en proteínas en microsomas de hígado de rata bajo efectos del fullereno. Al igual que Sayes *et al.* (2005), realizaron ensayos de inducción de toxicidad del fullereno con resultados citotóxicos por daño oxidativo mediante reducción de la peroxidación lipídica.
- Zhu *et al.* (2008), reportaron sus resultados sobre generación de estrés oxidativo por fullereno mediante incremento de Superóxido dismutasa y los niveles de peroxidación lipídica en el hígado de *Carassius auratus*.

El fullereno y sus derivados puede tener efectos bactericidas y otros en el inicio de la cadena respiratoria (Mashino *et al.* 2003; Fortner *et al.* 2005). Además de que la exposición a este compuesto puede incrementar las Especies Reactivas de Oxígeno en comunidades de bacterias de la carpa común (Elias – Letts *et al.*, 2010).

Conforme se han realizado estudios sobre la toxicidad del fullereno, en algunos de los casos han utilizado a especies del género *Daphnia* como organismos de ensayos ecotoxicológicos. Oberdöster, (2004b) y Zhu *et al.* (2006), fueron de los primeros en hacer estos ensayos agudos y reportando Concentraciones Letales Media (CL<sub>50</sub>) de 0.8 ppm, luego Lovern y Klapern (2006), reportaron sus resultados, obteniendo un CL<sub>50</sub> de 0.46 ppm en *D. magna*. Estos ensayos mostrados han sido llevados a cabo utilizando un solvente orgánico para las soluciones stock de fullereno, el Tetrahidrofurano (THF) fue el solvente en todos los ensayos.

Algunos casos nos muestran que utilizando al agua como solvente (disolviendo el fullereno con sonicación o agitación) se obtienen valores mucho mayores de la CL<sub>50</sub>, como los valores de 7.9 ppm (Lovern y Klaper, 2006), > 35 ppm (Zhu *et al.*, 2006), 10.5 ppm (Zhu *et al.*, 2009), y > 50 ppm (Baun *et al.*, 2008). En la Tabla 2 se presentan los resultados de los trabajos en *Daphnia* evaluando la toxicidad del fullereno.

**Tabla 2.** Efectos del fullereno reportados en *Daphnia magna*

<b>Año/Autor</b>	<b>Solvente</b>	<b>Medio de preparación</b>	<b>Resultado</b>
<b>Oberdöster – 2004</b>	Tetrahidrofurano (THF)	1 día	CL <sub>50</sub> : 0.8 mg/L
<b>Zhu <i>et al.</i> - 2006</b>	THF	1 día	CL <sub>50</sub> : 0.8 mg/L
<b>Lovern &amp; Klaper – 2006</b>	THF	1 día	CL <sub>50</sub> : 0.46 mg/L
<b>Zhu <i>et al.</i> – 2006</b>	Agua	1 día	CL <sub>50</sub> : > 35 mg/L
<b>Baun <i>et al.</i> – 2008</b>	Agua	2 meses	CL <sub>50</sub> : ≤ 50 mg/L
<b>Zhu <i>et al.</i> – 2009</b>	Agua	1 día	CL <sub>50</sub> : 10.5 mg/L
<b>Tao <i>et al.</i> - 2009</b>	THF	-	DL <sub>50</sub> : 0.4 mg/L y a nivel embrionario
<b>Vásquez - 2014</b>	Agua	2 meses	CL <sub>50</sub> : 4.8 mg/L
<b>Ardnt - 2014</b>	Agua	Compuestos	Resultados crónicos a nivel multigeneracional

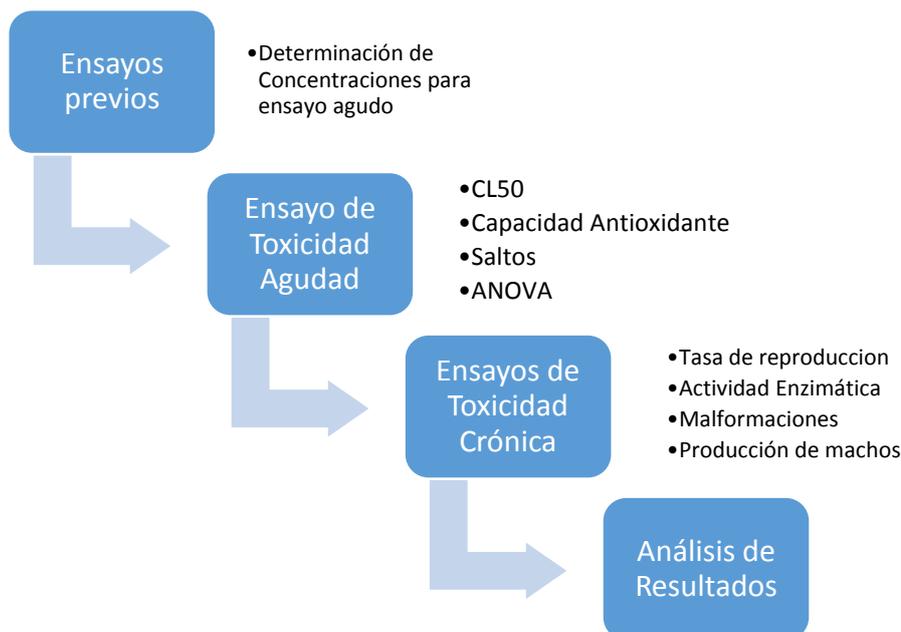
Tao *et al.* (2009) empezó a hacer trabajos sub letales de nanocristales de fullereno en solución acuosa en la *Daphnia magna* evaluando efectos sub letales como acumulación y afectación en embriones de hembras grávidas, obteniéndose una LD<sub>50</sub> baja (0.4 mg/L) y efectos negativos en la reproducción, la cual empezó a disminuir, además de una acumulación constante de este

compuesto. Finalmente, Ardnt (2014) ha realizado ensayos multigeneracionales de *D. magna* con derivados complejos del fullereno y mediante ensayos de genotoxicidad mediante la evaluación de genes que transcriban las enzimas Glutación Transferasa, Superóxido dismutasa y NADH deshidrogenasa, su trabajo reportó que no existen muchas diferencias en las expresiones de estos genes hasta una F<sub>2</sub>, pero con ligeros decrecimientos de esta expresión; aunque en el aspecto de mortalidad y reproducción si se vio afectado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron los ensayos ecotoxicológicos de tipo agudo para determinar la Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de una solución de fulereno en *D. magna*, además de otros mecanismos de respuesta rápida como el porcentaje de Capacidad antioxidante y el número de saltos.

Los ensayos de toxicidad crónica se realizaron para poder determinar los efectos que pueda tener a nivel reproductivo, además de evaluar la actividad enzimática y parámetros morfológicos. Esto será aplicado durante la generación parental (F<sub>0</sub>) hasta dos generaciones (F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>), mediante dos lotes: con tratamiento (utilizando la CL<sub>10</sub> del ensayo de toxicidad aguda) y su control (agua de reposo).



**Figura 7.** Esquema de trabajo

## **2.2. Preparación del medio de cultivo y soluciones de fulereno**

### **2.2.1. Preparación del medio de cultivo para *Daphnia magna***

Los individuos de *Daphnia magna* fueron obtenidos de un acuario local (Cleo, Lince, Lima). Los organismos fueron mantenidos en el laboratorio de Ecotoxicología Acuática de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El medio de cultivo consistió en una mezcla de hojuelas para peces Tetramin con pastillas del alga Spirulina y levadura en proporción 2:2:1. El agua se encontró reposada y declorinada, manteniendo condiciones de pH en un rango de 7 – 7.5 y una temperatura de 20 – 21 °C. Los medios de cultivo se mantuvieron en condiciones controladas de luz con un fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad.

### **2.2.2. Preparación de soluciones de fulereno**

La metodología es una variación de la empleada por Elias – Letts *et al.* (2010), esta consistió en utilizar una solución de 200 mg/L de fulereno (99.5% de pureza, SES Research, Houston). Estas fueron diluidas en agua miliQ y mezcladas con un agitador magnético durante un mes cubriendo el envase con papel aluminio, siendo centrifugadas a 14000 rpm durante una hora. El sobrenadante pasó por filtros de 0.45 µm y finalmente de 0.2 µm. El filtrado se concentró por evaporación mediante el uso de un rotoevaporador. Las concentraciones de fulereno fueron medidas con un analizador de carbono total

### 2.3. Ensayos de Toxicidad Aguda

Se colocaron 3 grupos de 10 neonatos de *D. magna* y fueron expuestas a cinco concentraciones de fullereno, el cual fue disuelto en agua de medio de cultivo en 20 mL por cada beaker. Las concentraciones fueron determinadas mediante un ensayo previo en el cual se encontró un 100% de mortalidad en la concentración más elevada. Las concentraciones determinadas fueron las siguientes: 20, 50, 80, 100 y 150 mg/L. El tiempo de duración de cada ensayo fue de 48 horas en oscuridad y se midieron parámetros fisicoquímicos como Sólidos Disueltos Totales (ppm), pH, Temperatura (°C) y Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (OECD, 2004).

Al finalizar el ensayo se realizaron conteos de saltos de los individuos *D. magna* durante un periodo de diez minutos mediante una modificación descrita por Tao *et al.*, 2011. Para la determinación de la  $CL_{50}/CE_{50}$  se empleó el criterio tomado de organismo afectado como la inmovilización del individuo. Finalmente, los individuos fueron analizados al estereoscopio, secados y pesados para ser conservados en frío en una solución de Buffer Fosfato Salino (PBS), los cuales han sido utilizados en el ensayo de capacidad antioxidante.

El ensayo también fue evaluado mediante el uso de controles negativos (agua de cultivo) y controles positivos (Dicromato de potasio según Gopi *et al.*, 2012).

### **2.3.1. Capacidad Antioxidante (Modificado de Brand-Williams et al., 1995)**

El ensayo de Capacidad Antioxidante consistió en diluir las muestras de *D. magna* en PBS para luego ser sonicadas y centrifugadas por diez minutos a 3500 rpm, las muestras serán mezcladas con 20 mg/L de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) para la muestra, metanol para el blanco de la muestra y un patrón de Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (PBS) y DPPH. El ensayo fue realizado por triplicado y leído a 517 nm luego de 5 minutos de iniciada la reacción.

#### **Cálculo de la Capacidad Antioxidante (% de captación de radicales libres)**

$$CA\% = [1 - (A2 - A3)/2] X 100$$

A1 = Absorbancia del patrón de referencia

A2 = Absorbancia de la muestra

A3 = Absorbancia del blanco de muestra

### **2.4. Ensayos de Toxicidad Crónica**

Para este ensayo a nivel multigeneracional se emplearon dos lotes, el control con agua de medio de cultivo y una concentración de fullereno que alcance el CL<sub>10</sub> obtenido del ensayo de toxicidad aguda y determinado con el Software Probit 1.5. Se colocaron cuatro individuos en un vaso de precipitado con 50 mL de solución, el tiempo empleado para cada ensayo fue de 15 días (Adaptado de Valdés, 2009 y OECD, 2012).

Los individuos fueron alimentados con preparado de Hojuelas de Tetramin, levadura en proporción 1:1 con 1mL cada dos días, mientras se hacía el recambio de soluciones. Se hizo el recuento de neonatos y retirados del vaso de precipitado. En el último conteo se utilizaron los neonatos de dicha camada para el siguiente ensayo en la generación posterior hasta alcanzar la F<sub>2</sub> (Adaptado de Sánchez, 2006).

Los individuos evaluados en cada ensayo fueron retirados al terminar el periodo empleado y fueron secados, pesados, medidos al estereoscopio y conservados en PBS a -4°C para su posterior análisis enzimático y de capacidad antioxidante.

#### **2.4.1. Determinación de Proteínas totales**

Para la cuantificación de proteínas se utilizó 10 µL de muestra de manera triplicada. Se incluyó en la lectura un Blanco (PBS) y se utilizó Albúmina de suero bovina (BSA) a partir de una concentración de 1mg/mL el cual serán los estándares de proteína. Se leerá en lector de ELISA, y finalmente con la curva formada por los estándares se calcularon las concentraciones de cada muestra.

### 2.4.2. Evaluación de Actividad Enzimática de Catalasa (Modificado de Aebi, 1974)

Se preparó la ***solución tampón para catalasa*** que estaba constituida de Tris-Base 1M y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, pH 8.0. Luego se preparó el ***medio de reacción*** de Peróxido de Hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de 10 mM, mezclando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% con 50 mL de agua destilada adicionando tampón de catalasa al stock. La medición de la catalasa consiste en la degradación del peróxido de hidrógeno a cada muestra añadida al stock de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm la cual fue medida durante cinco minutos. La fórmula ajustada para determinar la actividad de la catalasa en Unidades de Catalasa (UCAT)/ mg de proteína es la siguiente:

#### Fórmula:

$$\text{Actividad de Catalasa} \left( \frac{UCAT}{mg \text{ prot}} \right) = \left( \Delta \frac{Abs}{min} \cdot Dil \right) / (0.071 / Vm \cdot P)$$

Dónde:

$\Delta$  Abs/min = Diferencia de absorbancias final e inicial.

Dil = Dilución

Vm = Volumen de la muestra (0.01 mL)

P = concentración de proteínas (mg/mL)

### 2.4.3. Evaluación de Actividad Enzimática de Superóxido dismutasa (SOD, Modificado de Misra y Fridovich, 1972)

El ensayo se basó en la inhibición de la epinefrina la cual fue preparada a 30 mM con HCl a 10 mM. Se elaboró una curva de calibración de la enzima a las

siguientes concentraciones: 0, 0.006, 0.015, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12 y 0.25 nM de SOD, se realizaron las lecturas a 485 nm por cinco minutos, y se determinaron las Unidades de SOD mediante las gráficas de inversas de concentración e inhibición de epinefrina.

### **Ensayo de SOD**

En cada muestra se colocó 925 µl de buffer HCO<sub>3</sub>/CO<sub>3</sub>, 50 µl de muestra y 25 µl de epinefrina 30 mM. Las muestras fueron leídas a 485 nm durante cinco minutos. 1 Unidad de SOD (USOD) se determina por inhibir el 50% de epinefrina y los resultados son determinados en *USOD/mg proteínas*.

#### **2.4.4. Tasa Intrínseca de Reproducción**

La *Tasa Intrínseca de Reproducción Natural* ( $r$ ), se ha determinado con la cantidad de individuos que han sido contados en cada lote por tratamiento, y la fórmula básica ha sido establecida por Lotka en 1913:

$$\sum l_x \cdot m_x \cdot e^{-r \cdot x} = 1$$

Dónde:

$r$ : tasa intrínseca de incremento natural

$l_x$ : supervivencia (número de individuos vivos / total)

$m_x$ : reproducción (número de descendientes / número de hembras)

$x$ : edad (días transcurridos desde el inicio del experimento)

## 2.5. Procedimientos de análisis de datos

El procesamiento de datos se realizó mediante la Hoja de Cálculo Microsoft Excel 2010. La determinación de tamaño de los individuos de *D. magna* se realizó mediante el programa de tratamiento de imágenes ImageTool. La determinación del CL<sub>50</sub> y CL<sub>10</sub> del fulereno en *D. magna* se realizará con el programa PROBIT Versión 1.5 de la US.EPA, finalmente, el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v. 24 El cual consistió en un Análisis de Varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey y Duncan.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Ensayos de Toxicidad Aguda**

##### **3.1.1. Ensayos previos**

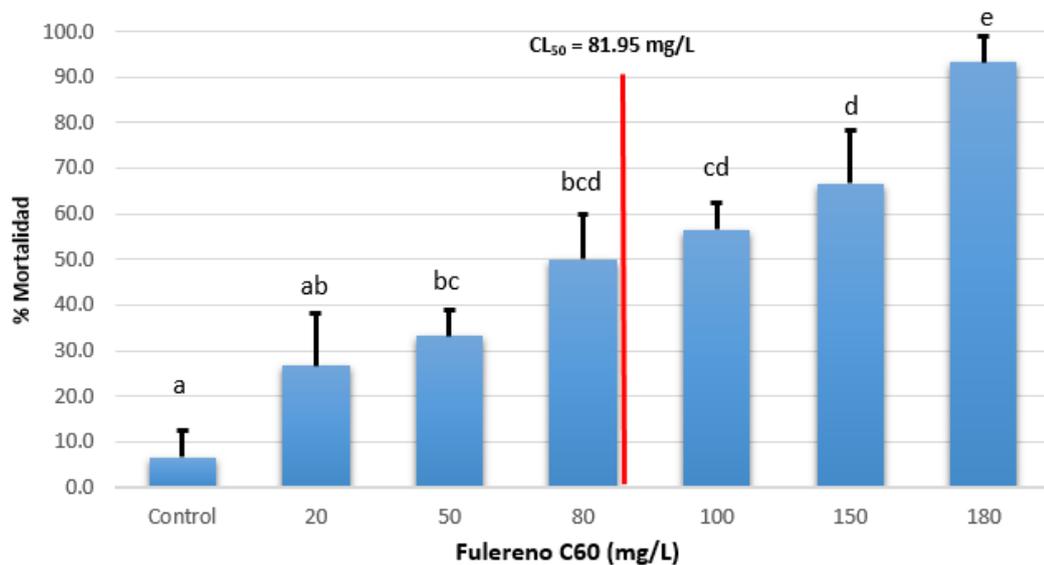
La concentración stock obtenida de fulereno C<sub>60</sub> para los ensayos de toxicidad fue de 180 mg/L. Esta concentración fue determinada mediante el analizador de carbono y utilizada en ensayos previos de toxicidad aguda. Se reportó un 99 % de mortalidad de individuos bajo esta concentración. De esta forma, el rango de las concentraciones utilizadas para los ensayos de toxicidad aguda fueron de 20, 50, 100, 150 y 180 mg/L, siendo el control el agua utilizada para el medio de cultivo.

##### **3.1.2. Mortalidad y Determinación de la CL<sub>50</sub>**

Se reportó resultados de mortalidad a nivel de porcentajes de la siguiente manera: 6.7% en el control, 26.7 % a 20 mg/L, 33.3 % a 50 mg/L, 50% a 80 mg/L, 56.7% a 100 mg/L, 66.7 a 150 mg/L y 93.3% a 180 mg/L (Figura 8). Estos resultados fueron procesados con el Software Probit 1.5 y nos indicaron un CL<sub>50</sub> de 81.95 mg/L con límites de confianza al 95% de 53.56 y 108.18 mg/L de Fulерeno en *Daphnia magna* ( $r^2 = 0.96$ ). El mismo software reportó el valor del CL<sub>10</sub> de 21.27 mg/L, siendo esta la concentración a utilizar en los ensayos de toxicidad crónica a nivel multigeneracional.

Los resultados fueron validados debido al bajo porcentaje de mortalidad en los controles negativos y a un CL<sub>50</sub> obtenido de 0.61 mg/L con dicromato de potasio en los controles positivos (Gopi *et al.*, 2012).

El ANOVA en el Software SPSS 24 realizado nos muestra que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), y ha separado en grupos a los tratamientos mediante la prueba post-hoc de Tukey.

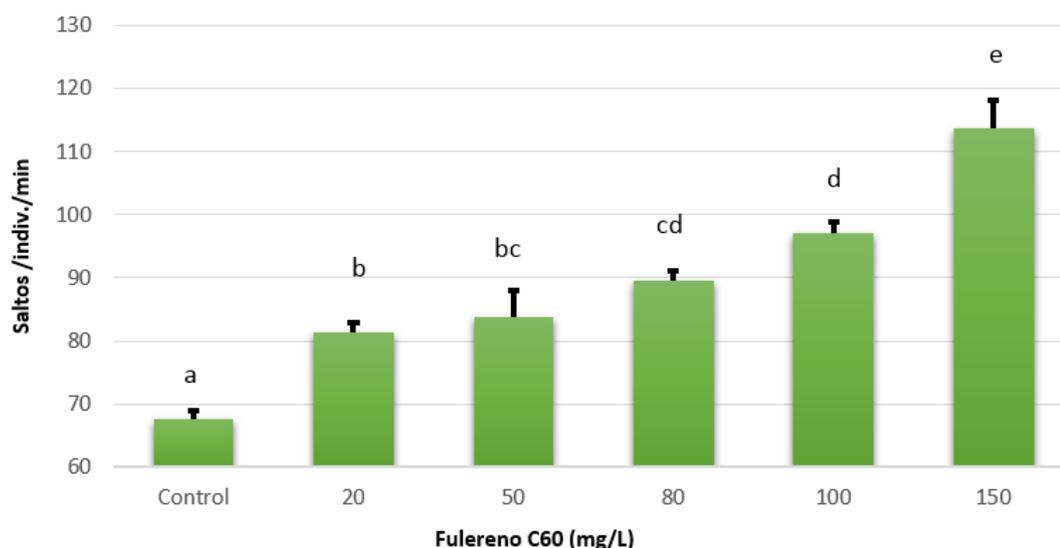


**Figura 8.** Concentración de Fulereno C<sub>60</sub> vs. Mortalidad de *Daphnia magna*. Se indica la CL<sub>50</sub> determinada mediante el Software PROBIT (73.77 mg/L). Las letras indican diferencias significativas entre grupos mediante la prueba de Tukey halladas en el ANOVA correspondiente ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.3. Frecuencia de saltos

Como se aprecia en la Figura 9, los resultados indican que existe una proporción entre la concentración empleada y el número de saltos que *D. magna* ha manifestado como respuesta, obteniendo un promedio de 67.60

saltos/individuo/min  $\pm$  1.44 en los controles, llegando hasta 113.73 saltos/individuo/min  $\pm$  4.50 en la concentración de 150 mg/L, mostrando una alta correlación ( $r^2 = 0.96$ ). El ANOVA indica que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), y la prueba de Tukey separa en cinco grupos. Solo existen diferencias significativas entre la concentración de 150 mg/L con respecto al resto de concentraciones inferiores en las cuales no existen diferencias significativas, además de presentar una fuerte correlación entre concentraciones y número de saltos ( $r^2 = 0.958$ ).

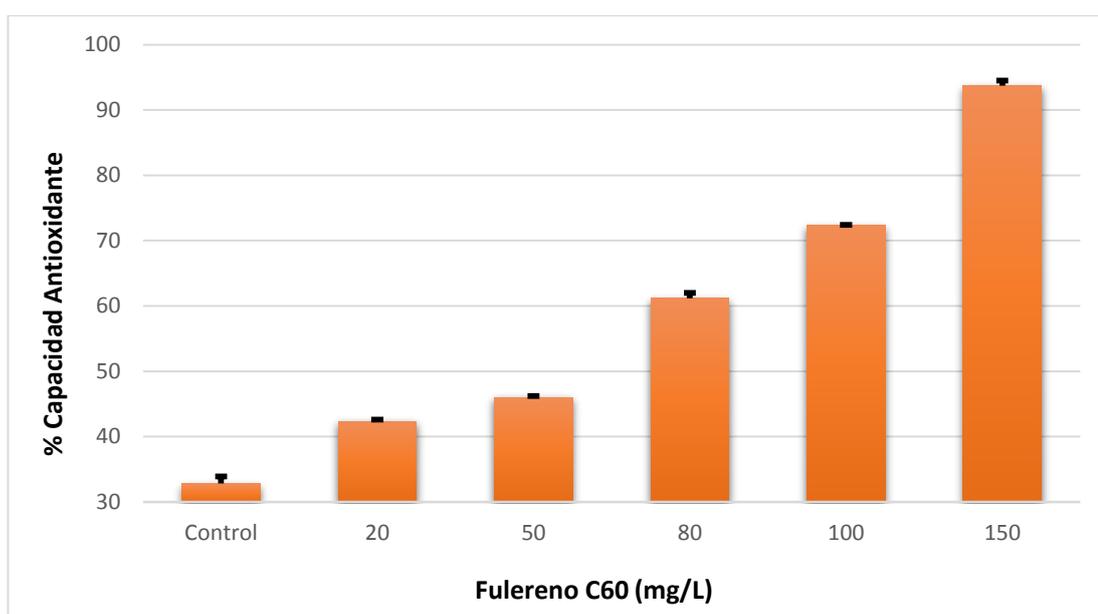


**Figura 9.** Concentración de Fulereno C<sub>60</sub> vs. Frecuencia de saltos en *Daphnia magna*. Las letras indican las diferencias significativas según la prueba de Tukey, de acuerdo con el ANOVA correspondiente ( $p < 0.05$ ).

#### 3.1.4. Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante es medida mediante el porcentaje de captación de radicales libres. Los resultados nos muestran que mantiene una correlación

positiva con respecto a la concentración de fulereno utilizada ( $r^2 = 0.97$ ). Se ha reportado valor basal de 32.83%/individuo en los controles y de 93.71%/individuo en la concentración de 150 mg/L. El ANOVA indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), y la prueba de Tukey separa a cada tratamiento como un grupo distinto (Figura 03).



**Figura 10.** Concentración de Fulereno C<sub>60</sub> vs. Capacidad Antioxidante (% de Captación de Radicales Libres). Conforme con el ANOVA realizado, se encontraron diferencias significativas en todos los grupos evaluados ( $p < 0.05$ ).

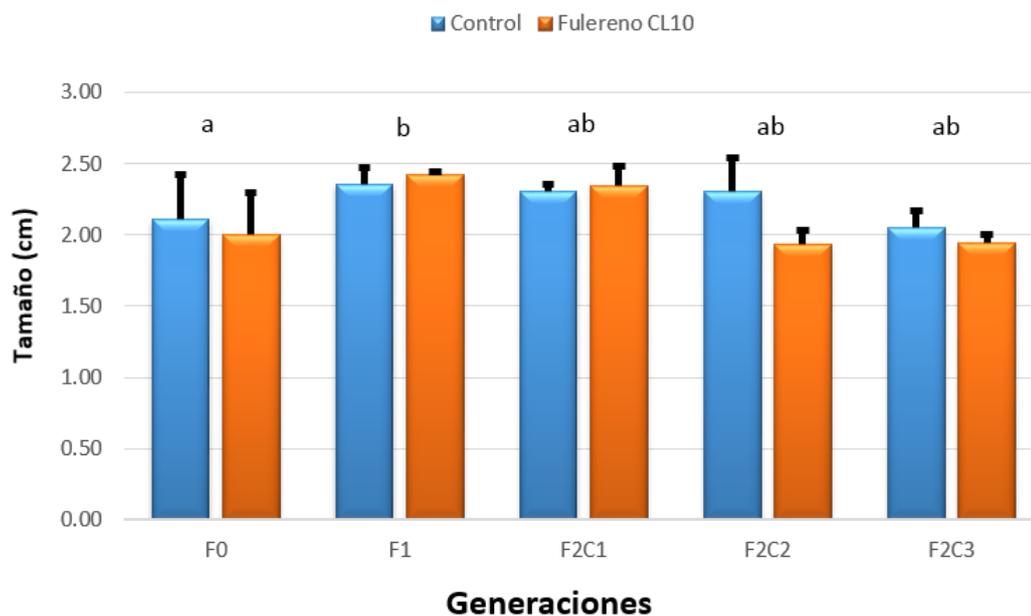
### 3.2. Ensayos de Toxicidad Crónica Multigeneracional

Luego de haber presentado los resultados de toxicidad aguda y los tipos de respuesta a este nivel, se realizaron los ensayos de toxicidad crónica con dos sistemas: el control o sin tratamiento de fulereno C<sub>60</sub> y con tratamiento con una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L. El ensayo fue realizado bajo tres generaciones: parentales o F<sub>0</sub>, la F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>. Se analizaron las enzimas Catalasa (CAT),

Superóxido dismutasa (SOD), la tasa de reproducción ( $r$ ), y parámetros morfológicos como la talla y peso. No se reportaron apariciones de individuos macho o malformaciones en las generaciones descendientes debido a las condiciones adversas del tratamiento.

### 3.2.1. Tallas y pesos

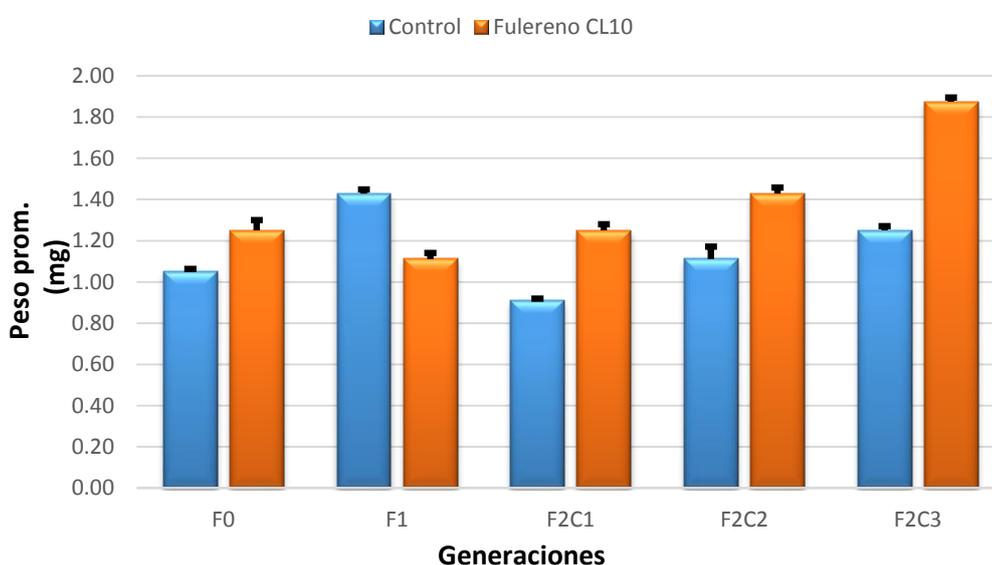
Con respecto a las tallas de *Daphnia magna* se ha encontrado decrecimientos en las medidas tomadas en los ensayos tratados con fulereno C<sub>60</sub> con respecto a los controles. Se reportaron los siguientes valores promedio en cada lote: En la F<sub>0</sub> los controles; 2.116 cm, con fulereno; 2.004 cm; en la F<sub>1</sub>, los controles reportaron 2.358 cm y los tratamientos con fulereno 2.427 cm; en la primera camada de la F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub> – C<sub>1</sub>) los controles mostraron valores promedio de 2.305 cm y con fulereno 2.344 cm; en la segunda camada (F<sub>2</sub> – C<sub>2</sub>) los controles reportaron 2.305 cm y con fulereno C<sub>60</sub> 1.933 cm; finalmente, en la tercera camada (F<sub>2</sub> – C<sub>2</sub>) los controles midieron 2.053 cm de promedio y con fulereno C<sub>60</sub> 1.943 cm. El ANOVA no obtuvo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos con o sin fulereno, y entre las tres generaciones sí se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), bajo el ANOVA de doble factor y la posterior prueba de Duncan. La Figura 11, nos muestra los resultados obtenidos a nivel multigeneracional.



**Figura 11.** Longitudes promedio (cm) de *Daphnia magna* a través de tres generaciones en tratamiento con fulereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento. Se reportó un ligero decrecimiento en los individuos tratados con fulereno con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las letras indican diferencias significativas entre generaciones bajo la prueba de Duncan.

Con respecto a los pesos medidos en *Daphnia magna*, se reportó un efecto inverso a las longitudes en los individuos evaluados. Los pesos tuvieron un ligero incremento en los tratamientos recibidos con respecto de los controles de la siguiente manera: En la F<sub>0</sub> los controles reportaron un promedio de 1.05 mg, con tratamiento un promedio de 1.25 mg; en la F<sub>1</sub> los controles reportaron un promedio de 1.43 mg y con tratamiento 1.11 mg; en la F<sub>2</sub>, la primera camada, (F<sub>2</sub> – C<sub>1</sub>) sin tratamiento reportó un valor promedio de 0.91 mg y con tratamiento un valor de 1.25 mg, la segunda camada (F<sub>2</sub> – C<sub>2</sub>), los controles reportaron un valor de 1.11 mg y con tratamiento un valor de 1.43 mg, finalmente la tercera camada (F<sub>2</sub> – C<sub>3</sub>) sin tratamiento reportó un valor

promedio de 1.25 mg y con fulereno C<sub>60</sub> reportó un valor de 1.88 mg. El ANOVA no encontró diferencias significativas entre tratamientos con y sin fulereno C<sub>60</sub>; tampoco entre generaciones, lo cual indica que también es una tendencia que se mantengan estas similitudes a nivel multigeneracional. En la siguiente figura se muestran los resultados de pesos obtenidos a través de estos ensayos.

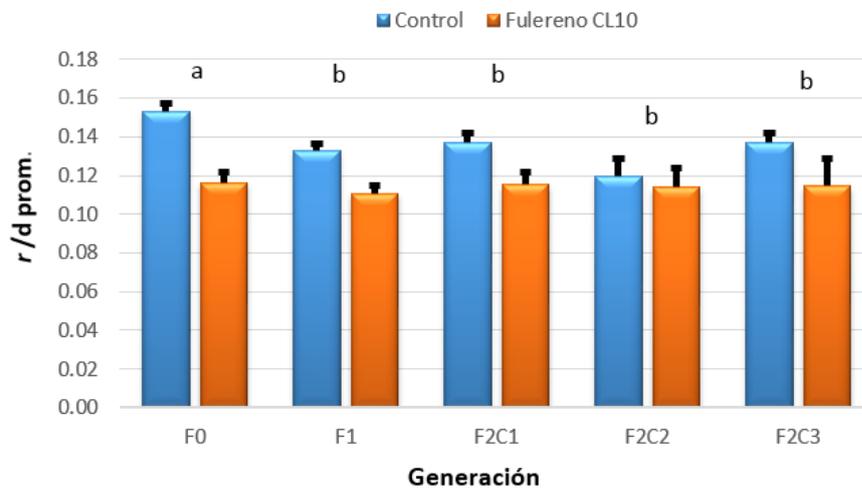


**Figura 12.** Pesos promedio (mg) de *Daphnia magna* a través de tres generaciones en tratamiento con fulereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento alguno. Se reportó un incremento en los individuos tratados con fulereno C<sub>60</sub>, sin embargo, el ANOVA no reportó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

### 3.2.2. Tasa de Reproducción

Los resultados obtenidos para la Tasa de reproducción intrínseca ( $r$ ) en *Daphnia magna*, nos muestran que existe un bajo crecimiento en los tratamientos con fulereno C<sub>60</sub> con respecto de los controles. Los valores de  $r$

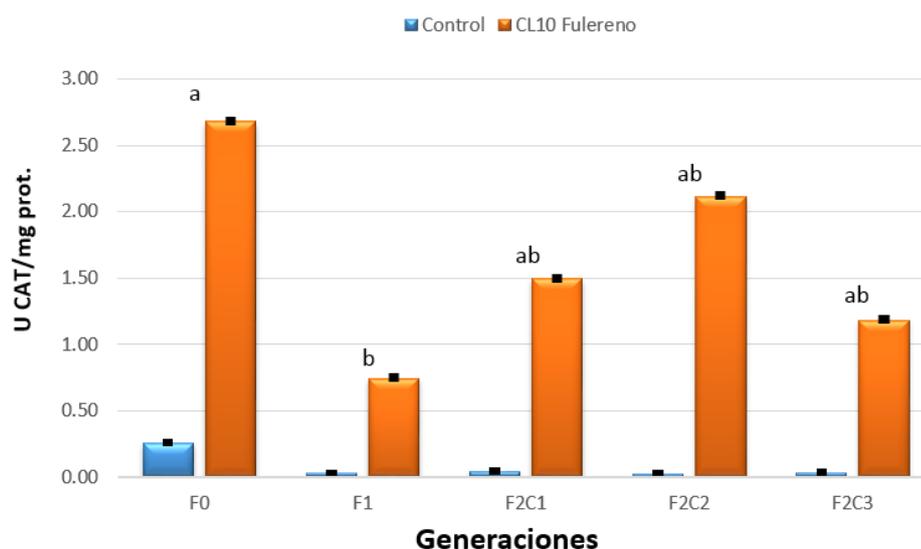
se encuentran en individuos/hembra/día y se muestran de la siguiente manera: En la F<sub>0</sub>, los controles reportaron un valor de 0.15 y con fulereno C<sub>60</sub> un valor de 0.12; en la F<sub>1</sub>, los controles reportaron un valor promedio de 0.13 y con fulereno C<sub>60</sub> un valor promedio de 0.11; en la primera camada de la F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub> – C<sub>2</sub>), se reportó un valor de 0.14 en los controles y con tratamiento un valor promedio de 0.12, en la segunda camada (F<sub>2</sub> – C<sub>2</sub>), se reportó un valor de 0.12 en los controles y un valor de 0.11 con fulereno C<sub>60</sub>; en la tercera camada se reportó un valor de 0.14 en los controles y un valor promedio de 0.11 con tratamiento. En ANOVA de doble vía indicó que si existen diferencias significativas entre tratamientos y entre los parentales con respecto a las demás generaciones ( $p < 0.05$ ). La Figura 13 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 13.** Tasas intrínsecas de reproducción promedio de *Daphnia magna* (individuos/hembra/día), en tratamiento con fulereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento. Se reportó un decrecimiento en los individuos tratados con fulereno, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambos tratamientos. Las letras indican diferencias significativas a nivel multigeneracional bajo la prueba de Duncan.

### 3.2.3. Actividad enzimática de Catalasa

Los resultados reportados para la enzima Catalasa (CAT) nos indican que existe un incremento marcado de esta actividad enzimática en *Daphnia magna* en los individuos que han sido tratados con fulereno C<sub>60</sub> a diferencia de los controles. Los resultados para la actividad enzimática de CAT se reportaron en U CAT/mg prot. En la generación parental F<sub>0</sub>, los controles reportaron un valor de 0.26, mientras que con tratamiento reportó un valor promedio de 2.68; en la F<sub>1</sub> los controles reportaron un valor de 0.03 y con tratamiento un valor de 0.74, en la primera camada de la F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub> – C<sub>1</sub>), los controles reportaron un valor de 0.04 y con tratamiento un valor de 1.49, la segunda camada (F<sub>2</sub> – C<sub>2</sub>) sin tratamiento reportó un valor de 0.03 y con tratamiento un valor promedio de 2.11; finalmente, la tercera camada (F<sub>2</sub> – C<sub>3</sub>) reportó un valor de 0.03 en los controles y un valor promedio de 1.18 con tratamiento de fulereno C<sub>60</sub>. Los resultados del ANOVA de doble vía indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), mientras que entre generaciones se mantiene existen diferencias entre los parentales y la F<sub>1</sub>. A continuación, la Figura 14 nos muestran los resultados de actividad enzimática de CAT.

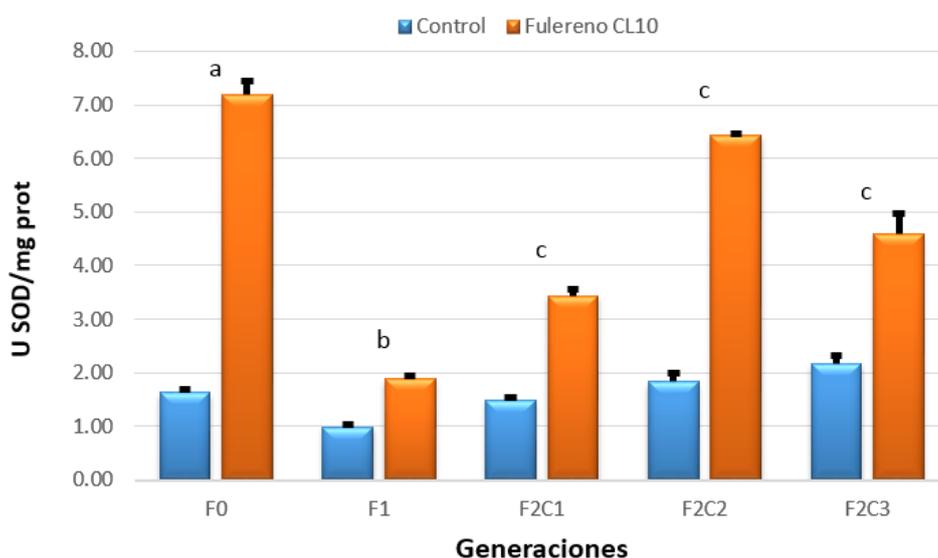


**Figura 14.** Valores promedio actividad enzimática de Catalasa de *Daphnia magna* (U CAT/mg proteínas) a través de tres generaciones en tratamiento con fullereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento. Se reportó un incremento en los tratamientos con fullereno, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las letras indican diferencias significativas entre generaciones mediante la prueba de Duncan.

### 3.2.4. Actividad enzimática de Superóxido Dismutasa

La evaluación de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) fue determinada en Unidades de SOD por mg proteínas en *Daphnia magna* a nivel multigeneracional (U SOD/mg prot.). Los resultados, al igual que la enzima CAT, también mostraron un incremento en los individuos que recibieron tratamiento con fullereno C<sub>60</sub>. En la F<sub>0</sub>, los controles dieron un valor de 1.63 a diferencia del tratamiento con fullereno C<sub>60</sub> que dio un resultado promedio de 7.19, los controles de la F<sub>1</sub> dio como resultado un valor promedio de 0.99 y con tratamiento un valor de 1.89, en la F<sub>2</sub>, su primera camada (F<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>) dio como valor promedio 1.48 en los controles y 3.44 con fullereno C<sub>60</sub>, la segunda camada (F<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>), reportó un valor de 1.83 en los controles y con

fulereno C<sub>60</sub> un valor de 6.44, y en la tercera camada (F<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), sin tratamiento se reportó un valor promedio de 2.18, y con tratamiento de fulereno C<sub>60</sub> un valor de 4.58. El ANOVA de doble factor indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos con fulereno y los controles ( $p < 0.05$ ), mientras que entre generaciones se reportó diferencias entre cada generación. La Figura 15 muestra los resultados obtenidos para este parámetro.



**Figura 15.** Valores promedio actividad enzimática de Superóxido Dismutasa de *Daphnia magna* (U SOD/mg proteínas) a través de tres generaciones en tratamiento con fulereno C<sub>60</sub> bajo una CL<sub>10</sub> de 21 mg/L y los controles sin tratamiento. Se reportó un incremento en los tratamientos con fulereno ( $p < 0.05$ ). Las letras indican diferencias significativas entre generaciones mediante la prueba de Duncan.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Ensayos de Toxicidad Aguda

#### 4.1.1. Mortalidad y CL<sub>50</sub>

Los resultados nos muestran que el valor de la CL<sub>50</sub> es mayor que los presentados por Oberdöster, (2004b) y Zhu *et al.* (2006), ya que ellos reportaron una CL<sub>50</sub> de 0.8 mg/L, y Lovern y Klapern (2006) con un valor de 0.46 mg/L. Estos ensayos reportados anteriormente han sido realizados con preparaciones de fulereno utilizando el solvente orgánico Tetrahidrofurano (THF), el cual se ha demostrado que tiene un efecto en la toxicidad del fulereno, interfiriendo en los resultados (Henry *et al.*, 2007). Cuanto mayor sea la solubilidad en agua exhibida en una muestra de fulereno, menor será la toxicidad asociada con la exposición (Johnston *et al.*, 2010).

Se han reportado ensayos de toxicidad aguda con preparaciones de fulereno por sonicación o agitación en agua en *Daphnia*, lo cual nos reportan valores de CL<sub>50</sub> mayores, indicando una disminución considerable en su toxicidad, siendo los más relevantes 4.8 mg/L (Vásquez, 2014), 7.9 mg/L (Lovern y Klapern, 2016), > 35 ppm (Zhu *et al.*, 2006), 10.5 mg/L (Zhu *et al.*, 2009), y > 50 mg/L (Baun *et al.*, 2008). Esto nos indica que existen muchas variaciones en los resultados, sin embargo, no se debe descartar que existe un riesgo de mortalidad en *Daphnia magna* como una primera respuesta a nivel agudo.

Algunas diferencias en los valores de CL<sub>50</sub> en *D. magna* no solo pueden surgir debido al tamaño de los agregados sino también al tipo de preparación que pueden hacer variar sus propiedades físicoquímicas. Mientras que para el presente estudio, las preparaciones de las soluciones de fullereno C<sub>60</sub> fueron hechas en frascos cubiertos, Vásquez (2014) realizó sus ensayos con preparados en agitaciones en condiciones de iluminación, lo cual puede incrementar su toxicidad, y a su vez que otros autores indican que la luz tiene un efecto que incrementa la actividad pro-oxidante del fullereno (Lee *et al.*, 2008).

#### **4.1.2. Respuestas mediante Frecuencia de Saltos**

Como ya se había mencionado, *Daphnia* tiene respuestas de escape ante tóxicos en el medio (Lopes *et al.*, 2004), es por ello que se realizó un estudio para analizar el comportamiento bajo la modalidad de saltos producidos en el nado de *Daphnia magna*.

En cuanto al parámetro de la frecuencia de saltos, los resultados nos indican que ante tratamientos con fullereno se tiende a incrementar la frecuencia conforme se aumentan las concentraciones. Esto puede ser un riesgo para *D. magna* ya que existen estudios que revelan que este comportamiento en el nado se encuentra relacionado a la facilidad con la cual pueden ser detectados por sus predadores (Gorski y Dodson, 1996). Sin embargo, a nivel de calidad de agua, confirman que es un excelente indicador a corto plazo de que existen perturbaciones en el medio. Este comportamiento de evasión ya ha sido

utilizado en otras especies como en las lombrices terrestres (Yeardley *et al.*, 1996).

Lovern *et al.* (2007) hizo sus ensayos de fulereno en *D. magna* utilizando una concentración de 0.26 mg/L con un incremento de hasta 161.06 saltos/min en comparación con los individuos que no se encontraban bajo este tratamiento (47.89 mg/L). Tao *et al.* (2011), reportaron valores de 64.33 saltos/min (previo tratamiento) hasta un incremento en 123.17 saltos/min (post-tratamiento) a concentraciones de 0.1 mg/L de fulereno C<sub>60</sub>, sin embargo, cabe resaltar qué así como en los valores de la CL<sub>50</sub> se vio incrementada la toxicidad por un solvente orgánico, también se utilizó THF como un solvente del fulereno en ambos reportes. Vásquez (2014) utilizó soluciones de fulereno en agua, reportando valores entre 120 saltos/min (controles) y 160 saltos/min (1 mg/L). Estos resultados reportados por diversos autores confirman la utilidad de la evaluación de frecuencias de saltos de *Daphnia magna* a nivel agudo en exposición a fulereno C<sub>60</sub>.

#### **4.1.3. Capacidad Antioxidante**

En el presente trabajo, los resultados muestran un gran incremento de capacidad antioxidante a una concentración de 150 mg/L. Siendo un porcentaje mayor al reportado por Vásquez (2014). Esto también es debido a que las concentraciones utilizadas fueron mucho menores a las del presente trabajo.

Se puede inferir que en ambos casos que la capacidad antioxidante se manifiesta a concentraciones mayores de fullereno. Se ha reportado que el fullereno es un compuesto capaz de generar Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) que pueden afectar a organismos (Lovern y Klaper, 2006; Kong *et al.*, 2012), lo cual nos indica que en el corto plazo, se puede manifestar esta respuesta fisiológica en los individuos evaluados, pero se requieren concentraciones considerables y mayores que la literatura citada para obtener el efecto esperado.

## **4.2. Ensayos de Toxicidad Crónica Multigeneracional**

### **4.2.1. Tallas y Pesos**

Los parámetros morfológicos se pueden considerar como biomarcadores a nivel individual de un organismo, debido a que el concepto de biomarcador ha sido definido como una respuesta a un químico o contaminante, la cual demuestra una desviación del estado normal del individuo (Walker *et al.*, 2012). En el caso de *Daphnia magna* se utiliza y recomienda las medidas de longitud y peso en protocolos ecotoxicológicos (US.EPA, 1996; OECD, 2012).

#### **a. Tallas**

El presente estudio muestra que las longitudes de *D. magna* en tratamientos con fullereno son menores con respecto de los controles en las generaciones parentales (F<sub>0</sub>), y en las camadas 2 y 3 de la F<sub>2</sub>, aunque no se encuentran diferencias significativas según el ANOVA de dos factores entre tratamientos,

más si en las generaciones ( $p < 0.05$ ). Esto indica que las tallas no se ven afectadas de manera directa por el fullereno  $C_{60}$  a nivel multigeneracional. Por otro lado, se tiene que tener en cuenta que la mayor cantidad de individuos con los menores tamaños se presentaron en la última generación. Esto indica que se requieren mayores estudios para poder tener una certeza de la razón de decrecimiento de longitud conforme pasan las generaciones.

No se ha reportado directamente resultados de longitudes de *D. magna* en exposición al fullereno  $C_{60}$ . Sin embargo, Ardnt (2014) trabajó con varios derivados de fullereno sintetizados en laboratorio, evaluando la exposición en *D. magna* a 21 días durante las generaciones  $F_0$ ,  $F_1$  y  $F_2$ , reportó valores de longitudes, enzimas en forma de transcritos y tasa de reproducción. En el caso de los tamaños, bajo una concentración de 50 mg/L de los derivados de fullereno  $C_{60}$  hubo un decrecimiento del 6.6% con respecto de los controles ( $U = 32$ ,  $p < 0.05$ ), siendo menor este decrecimiento en relación a otros nanocompuestos como los nanotubos de simple (SWCNT) y múltiple pared (MWCNT).

Otros estudios han mostrado que la reducción de tamaño en individuos expuestos a contaminantes es un parámetro utilizado a nivel crónico en *D. magna*. Dave (1984) reportó decrecimientos 0.32 mm con respecto de los controles en *D. magna* en ensayos crónicos de 21 días en exposición a cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). Kamaya *et al.* (2005) hizo lo propio con el ácido dehidroabiético (DHA) y ácido abiético (ABA), reportando un decrecimiento de

hasta 0.32 mm a 8 mg/L de DHA y hasta 0.4 mm en ABA con respecto de los controles. Lu *et al.* (2015) evaluaron las actividades enzimáticas de CAT, SOD y Acetilcolinesterasa (AChE) de *D. magna* en exposición a compuestos perfluorados como el ácido perfluorononanoico (PFNA) y el sulfonato perfluorooctano (PFOS) bajo ensayos crónicos de 20 días. La combinación de estos compuestos tiene una inhibición en el decrecimiento de tallas, demostrando un efecto antagónico.

Debido a que la diferencia de tamaños que han sido reportadas ha sido poco significativa o solo significativa con respecto de los controles, los autores han concluido que con respecto a los tóxicos evaluados en este parámetro, el tamaño tiene poca relevancia a nivel ecológico. Esta conclusión puede ser empleada en el presente trabajo, añadiendo que el fullereno C<sub>60</sub> no ha tenido algún efecto de malformaciones congénitas según los individuos observados en cada una de las generaciones evaluadas.

### **b. Pesos**

En el caso de los pesos el efecto fue el inverso con respecto a las tallas, al observarse un incremento en tratamientos con fullereno C<sub>60</sub>. No obstante, el ANOVA de doble factor indicó que no existen diferencias significativas entre generaciones y tratamientos, pero si existe una correlación negativa entre tallas y pesos ( $r = -0.535$ ).

Este parámetro estadísticamente no es relevante, sin embargo, la literatura comprueba que existe un efecto de acumulación del fullereno C<sub>60</sub> en *D. magna*

que puede influir en el peso y carga corporal. Tervonen *et al.* (2010) reportaron que los agregados de fullereno pueden encontrarse suspendidos por semanas o meses en el agua, siendo blanco de rápida y significativa absorción (incrementaron el peso en un 0.45% a las 24 horas de ensayo a 2 mg/L de C<sub>60</sub>), formando aglomerados en el tracto digestivo de *D. magna*, esto conlleva a una lenta depuración y sedimentando los residuos de C<sub>60</sub>, decreciendo la exposición a otros organismos en los cuerpos de agua, pero incrementando la exposición para los organismos bentónicos en los sedimentos. Esta acumulación también fue reportada Tao *et al.* (2016), con incrementos de hasta una carga máxima de 24.33 mg/kg en exposición al fullereno C<sub>60</sub>, pero con resultados adversos para el pez cebra *Danio rerio*, con decrecimientos del peso e inclusive el tamaño, esto relacionado a la inhibición de enzimas digestivas, lo cual indica que los consumidores de *D. magna* pueden verse afectados por la acumulación del fullereno C<sub>60</sub> de manera indirecta, pudiendo perjudicar las cadenas tróficas acuáticas.

#### **4.2.2. Actividad Enzimática**

El sistema de enzimas Superóxido Dismutasa y Catalasa (SOD-CAT) provee la primera línea de defensa contra la toxicidad de las ERO's. La SOD cataliza la dismutación del anión radical Superóxido a agua y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el cual es atacado por la CAT. Generalmente, una respuesta de inducción simultánea en las actividades de estas enzimas puede ser observada cuando se encuentran expuestas a contaminantes (Dimitrova *et*

*al.*, 1994; Pandey *et al.*, 2003). Este sistema de defensa no solo ha sido estudiado en *Daphnia magna*, sino con otros organismos como ratas (Jurczuk *et al.*, 2003; Patlolla *et al.*, 2009), peces (An *et al.*, 2008; Saliu y Bawa-Allah., 2012; Karadag *et al.*, 2014), e inclusive plantas (Cavalcanti *et al.*, 2004; Dey *et al.*, 2007).

El fulereno C<sub>60</sub> tiene propiedades antioxidantes (Gharbi *et al.*, 2005; Trajkovic *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009; Andrievsky *et al.*, 2009) y pro-oxidantes (Kamat *et al.*, 2000; Sayes *et al.*, 2004; Sayes *et al.*, 2005, Kong, *et al.*, 2012). Las propiedades pro-oxidantes se encuentran relacionadas a la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's), (Lee *et al.*, 2008) y ocasionando efectos tóxicos (Sayes *et al.*, 2004). Los mecanismos de producción de estas especies en soluciones acuosas de fulereno ya han sido estudiadas por algunos autores, donde mencionan que la luz es un importante factor para la formación de ERO's, aunque también pueden formarse directamente desde agentes reductores a singletes de oxígeno y posteriormente a los radicales como anión Superóxido o Peróxido de Hidrógeno (Yamakoshi *et al.*, 2003; Markovic y Trajkovic, 2008).

Muchos estudios han mostrado que el fulereno posee esta propiedad pro-oxidante en presencia de luz (Lee *et al.*, 2008.; Isaacson *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2012), y estas han sido aprovechadas en ciertas aplicaciones medicinales como la eliminación de células tumorales por producción de estas ERO's (Burlaka, *et al.*, 2004) y en muchas aplicaciones biomédicas (Markovic y

Trajkovic, 2008). Cabe resaltar nuevamente que las soluciones acuosas de fulereno C<sub>60</sub> para este estudio han sido preparadas a oscuras, de esta manera, se pretende conocer si el fulereno C<sub>60</sub> de manera individual, posee propiedades de generación de ERO's sin el apoyo de la luz. Los resultados muestran que existe un incremento de actividad antioxidante por enzimas en los tratamientos con fulereno C<sub>60</sub> en *Daphnia magna*.

No se tiene una base de datos o referencia de la actividad enzimática de estas enzimas en tratamientos con fulereno C<sub>60</sub> en *Daphnia magna*, sin embargo, Ardnt (2014) en sus resultados con derivados del fulereno C<sub>60</sub> si encontró resultados con respecto a enzimas, siendo el C<sub>60</sub>-amino- $\gamma$ CD y C<sub>60</sub>-malonato- $\gamma$ CD los que indujeron el incremento entre 30 y 39 veces los transcritos del complejo Vitelógeno-Superóxido Dismutasa (VTG-SOD) a concentraciones de 1 ppm en la F<sub>0</sub>, y esta expresión no cambió en las siguientes generaciones y mostrando diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). Su trabajo implica que existe una relación entre la desintoxicación de superóxidos y el metabolismo de vitelogenina. De esta manera estos resultados pueden no solo relacionarse a un problema de estrés oxidativo, sino también de diapausa en formación de embriones, lo cual se puede asociar a un problema de reproducción.

La implicancia de este sistema en *Daphnia magna* ha sido explicada por diversos autores con una gama de resultados en otros contaminantes orgánicos e inorgánicos. Fan *et al.* (2012) analizaron los niveles de CAT y SOD en *D. magna* en presencia de contaminantes, utilizando tratamientos con

Cobre y TiO<sub>2</sub>. La actividad de SOD y CAT alcanzaron valores de 208.2% mayores que el control para CAT (control = 200 - 250 USOD/mg prot.) y 504.81% mayores que el control para el caso de SOD (control = 7 - 8 UCAT/mg prot.), en tratamientos con Cobre y TiO<sub>2</sub> a 10 µg/L, mientras que en los tratamientos sin TiO<sub>2</sub>, los picos máximos se alcanzaron a los 20 µg/L, para luego disminuir la actividad en ambas enzimas ( $p < 0.01$ ), conforme se incrementaba las concentraciones en ambos tratamientos; indicando que existe una gran actividad enzimática en ensayos crónicos de 3 días, pero luego las concentraciones del tóxico tienden a alterar este sistema SOD-CAT y apagar este tipo de actividad antioxidante.

Los ensayos ya mencionados anteriormente de Lu *et al.* (2015) con PFOS y PFNA en *D. magna* mostraron un incremento de las actividades enzimáticas en 5 USOD/mg prot con respecto del control a 0.04 mg/L de ambos compuestos, y un incremento en 5-10 µmol/mg prot de CAT con respecto del control en ambos compuestos hasta una concentración de 0.008 mg/L. Las actividades enzimáticas comenzaron a disminuir considerablemente al incrementar las concentraciones de PFOS y PFNA hasta 5 mg, viéndose reducida su actividad en un 73-75% para CAT y 30-50% para SOD ( $p < 0.05$ ). Se deduce que parcialmente las actividades enzimáticas se incrementan permitiendo al organismo sobrellevar el estrés oxidativo. No obstante, debido al exceso de producción de ERO's, con una concentración mayor de un tóxico se producirá un decrecimiento significativo de esta primera línea de defensa de enzimas antioxidantes (Zhu *et al.*, 2010).

Por otra parte, la edad influye siendo un factor importante al momento de reportar datos de actividad enzimática del sistema SOD-CAT. En el presente trabajo se reportaron actividades enzimáticas de individuos al finalizar el ensayo crónico de 15 días. Por otra parte, Arzate-Cárdenas *et al.* (2011), reportó que el sistema SOD-CAT y otras enzimas responden a edades más tempranas (en días) de *Daphnia magna*. En tratamientos con Cromo VI a 0.032 mg/L y a 24 horas en diferentes tiempos de vida, resultaron con un mayor incremento de enzimas CAT (picos de 9 log k/mg prot.;  $p < 0.05$ ), y SOD (picos de 80 USOD/mg prot.;  $p = 0.76$ ), llegando hasta individuos de cinco días de edad, siendo donde aproximadamente inicia la etapa reproductiva. Sin embargo, en días posteriores al séptimo día decrece toda actividad enzimática. Lo cual implica que los estados más juveniles tienden a ser más sensibles según este y otros autores (Hoang y Klane, 2007; Muysen y Janssen, 2007).

Wu *et al.* (2011) evaluaron estas enzimas bajo ensayos de 10 días, evaluado los efectos del diésel 20 y el 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). Los resultados mostraron que la SOD no tuvo un incremento significativo, y se manifestó al primer día de evaluado, mientras que las enzimas CAT y GPx si mostraron incrementos durante todo el periodo de tratamiento. El estudio menciona que la concentración de SOD actual es suficiente para poder reducir los iones Superóxido formado durante la exposición a estos compuestos. La diferencia entre las GPx y la CAT radica que las GPx se encargan también de la reducción no solo de  $H_2O_2$  sino también de lipoperóxidos, siendo una enzima

de protección contra peroxidación lipídica, y su especialidad son muchos de los peróxidos orgánicos. Los autores concluyen que es menor su participación en la reducción de  $H_2O_2$ . Es por ello que utilizando CAT y SOD se puede tener un completo análisis de la primera línea de defensa ante el estrés oxidativo en diversas especies y utilizar otras enzimas puede servir de complemento a estudios posteriores.

Debido a que el sistema de Capacidad Antioxidante puede manifestarse por un incremento de vitaminas o por estrés oxidativo, se hicieron las evaluaciones de actividad enzimática en los ensayos crónicos multigeneracionales. Los resultados del presente trabajo indican que existe una relación entre el incremento de CAT y SOD con respecto de la Capacidad Antioxidante mostrada en los ensayos de toxicidad aguda. Además de mostrar diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), se infiere que el fullereno  $C_{60}$  tiene un efecto tóxico de estrés oxidativo en *D. magna*, y no existen diferencias significativas entre generaciones ( $p > 0.05$ ), lo cual sugiere que el comportamiento de éste sistema SOD-CAT es el mismo desde los parentales hasta la  $F_2$ .

La segunda camada de la  $F_2$  ha mostrado el mayor nivel de incremento en ambas enzimas, sin embargo, los niveles vuelven a disminuir en la tercera camada. Solo existen diferencias significativas en el caso de SOD entre las camadas de esta generación. Se explica que la generación  $F_1$  luego de haber mandado la primera camada de la  $F_2$ , esta generación no tiene suficiente daño oxidativo, caso contrario en la segunda camada, donde la  $F_1$  ha tenido un

tiempo aproximado de diez días, sin embargo, la tercera camada disminuye su actividad, lo que se puede deducir conforme a la literatura mencionada que la F<sub>1</sub> tuvo un incremento acumulado de estrés oxidativo y las enzimas tienden a disminuir su actividad, lo cual fue transmitido a la última camada de la F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>). Se requieren mayores ensayos entre camadas de cada generación para poder afirmar con certeza dichos resultados.

Los resultados son similares con los de Arndt (2014) al mostrar incrementos de SOD bajo tres generaciones, pero con diferentes tipos de evaluación y compuestos sintetizados de fulereno. Sin embargo, se requieren otros estudios a los siguientes niveles de defensa antioxidante para poder determinar las rutas finales de desintoxicación de fulereno C<sub>60</sub>. Mientras que a nivel agudo como primera respuesta puede manifestarse la Capacidad Antioxidante de *D. magna* en exposición al fulereno. La SOD puede ser un buen indicador a nivel crónico e inclusive multigeneracional en exposición al mismo compuesto. Finalmente, el presente estudio reporta que existe esta respuesta de estrés oxidativo por producción de ERO's sin necesidad de la luz en fulereno C<sub>60</sub>, pero debido a que se ha obtenido una CL<sub>10</sub> elevada para los ensayos de toxicidad crónicos, se deduce que el fulereno tiene un efecto tóxico a concentraciones elevadas con una positiva respuesta de actividad enzimática antioxidante.

### 4.2.3. Tasa Intrínseca de Reproducción

Los resultados nos indican que la tasa intrínseca de reproducción ( $r$ ) de *Daphnia magna* se vio reducida en los tratamientos con fulereno C<sub>60</sub> con respecto de los controles ( $p < 0.05$ ), y estos resultados se han mantenido en todas las generaciones evaluadas, lo cual indica que existe un problema a nivel reproductivo que puede significar una desventaja en cuanto a la supervivencia de este crustáceo con el paso del tiempo ante exposiciones sucesivas al nanocompuesto evaluado. La importancia de estudiar la demografía u otras medidas de crecimiento poblacional se usan muy a menudo para evaluar la toxicidad (Villarroyel, 2004; Sánchez, 2009; Lu *et al.*, 2015). El estudio de las poblaciones toma en cuenta los efectos letales y sub letales que puede tener un tóxico sobre la población de una especie a través de su esperanza de vida (Stark y Vargas, 2005), y en comparación con otros *endpoints*, la tasa intrínseca de reproducción es muy superior a muchos de estos parámetros de efectos (Herbert *et al.*, 2004).

Campos *et al.* (2016) evaluaron los efectos multigeneracionales a nivel de reproducción de tres insecticidas (4-Nonilfenol, butóxido de piperonilo, tributilo de estaño) en *Daphnia magna* bajo los lineamientos de la OECD. Los resultados con respecto al valor de  $r$  mostraron que los insecticidas tienen un efecto negativo conforme se analiza en las generaciones de F<sub>1</sub>, especialmente el butóxido de piperonilo (PBO) y el 4-Nonifenol, inclusive se vio afectado el crecimiento en longitud de *D. magna* ( $p < 0.01$ ). La tercera camada de la F<sub>1</sub>

fue la generación mayormente afectada durante los ensayos en ambos parámetros evaluados a nivel de valores de  $r$ .

Chen *et al.* (2014) reportaron los efectos en tres generaciones (Parentales,  $F_1$  y  $F_2$ ) del pentaclorofenol en *D. magna*. Sus resultados indicaron que el valor de  $r$  se ve reducido en las tres generaciones a un valor de 0.2  $\mu\text{mol/L}$  de pentaclorofenol siendo a este nivel en donde se encuentran diferencias significativas en comparación con las demás concentraciones menores utilizadas ( $F_0 = 0.1864$ ,  $F_1 = 0.1692$ ,  $F_2 = 0.1389$ ). Adicionalmente reportaron que la  $F_1$  tuvo un mayor efecto tóxico en cuanto al decrecimiento del valor de  $r$  en una mayor cantidad de concentraciones utilizadas en comparación con las otras generaciones, de manera que  $F_1 > F_2 > F_0$  con respecto al efecto tóxico. En el presente estudio la  $F_1$  fue la que tuvo un menor incremento de  $r$ .

Uno de los resultados con mayor relación entre las concentraciones de un tóxico con respecto a la tasa de reproducción fue reportado por Heckmann *et al.* (2007). Evaluando el efecto a nivel crónico en ensayos de 14 días mostraron que existe una fuerte correlación negativa entre las concentraciones de ibuprofeno con respecto a la tasa de reproducción ( $r = -0.945$ ,  $p < 0.001$ ) de *D. magna*, debido a que las concentraciones utilizadas fueron mayores a los valores normales en el ambiente, estas pequeñas concentraciones no tienen una relevancia a nivel de impacto ecológico. En el caso del fulereno  $C_{60}$  se desconoce las concentraciones normales en el

ambiente, por ello se ha evaluado a partir de una concentración sub letal para *D. magna* como la CL<sub>10</sub>.

A nivel de nanocompuestos, Volkär *et al.* (2013) utilizaron Nanoplata para sus ensayos multigeneracionales en *D. magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia galeata* en cinco generaciones (F<sub>0</sub> – F<sub>4</sub>) durante 21 días. Los resultados mostraron que *D. magna* fue la especie menos sensible de las tres evaluadas. Sin embargo, presentaron un incremento muy bajo en el valor de *r*, especialmente la generación F<sub>4</sub>. Estos estudios indican que probablemente, debido al mayor tamaño de *D. magna* con respecto de las otras especies puede significar una ligera tolerancia mayor a este nanocompuesto.

El bajo incremento de la tasa intrínseca de reproducción se encuentra relacionado al estrés tóxico que pueda tener *D. magna*, el cual altera muchas de las fracciones de reserva de energía (Cowgill *et al.*, 1984, Muysen y Janssen, 2001). Además de ello, la reproducción se ve afectada cuando el aparato digestivo de *Daphnia* se ve copado de acúmulos de nanocompuestos como la nanoplata y esto impide que se tenga un buen consumo de alimento, lo cual conlleva a una mala reproducción y disminución de tamaño (Zhao y Wang, 2011). A pesar que no hubo estos acúmulos en el trabajo de Volkär *et al.*, en el presente estudio si se presentaron acumulaciones de fullereno en todas las generaciones en tratamientos con fullereno C<sub>60</sub> a 21 mg/L.

Volviendo nuevamente el trabajo multigeneracional con *D. magna* de Ardnt (2014) con derivados de fullereno C<sub>60</sub>, reportó que estos a una concentración

por debajo de los 50 mg/L no presentan decrecimientos significativos. Los derivados de fullereno fueron menos tóxicos en comparación de los otros compuestos estudiados (SWCNT y MWCNT). En contraste con el presente trabajo, donde se reportaron valores menores de  $r$  en tratamientos con fullereno C<sub>60</sub> puro a 21 mg/L, lo cual es una concentración a tener en cuenta para posteriores estudios.

Adicionalmente, se observaron en las camadas de cada generación si hubo aparición de machos, no se reportó algún individuo de este sexo, de esta manera, el fullereno C<sub>60</sub>, no presenta las condiciones adversas necesarias para la inducción de machos e iniciación del ciclo sexual reproductivo como otros compuestos (Matsumoto *et al.* 2008; Abe *et al.*, 2015).

La evaluación correspondiente nos indica que la reproducción es un importante parámetro para la evaluación multigeneracional de fullereno C<sub>60</sub> en *D. magna* y este parámetro puede encontrarse relacionado al estrés oxidativo, además excesiva acumulación de este nanocompuesto en las cavidades de este organismo pueden interferir en su buen desarrollo fisiológico alterando su crecimiento y reproducción

## CONCLUSIONES

- De los ensayos de toxicidad aguda se ha podido determinar que *Daphnia magna* manifiesta respuestas por exposición al fullereno C<sub>60</sub> a nivel letal (CL<sub>50</sub> = 81.95 mg/L), de comportamiento (incrementando el número de saltos al aumentar la concentración de fullereno) y a nivel fisiológico (Incremento de la Capacidad Antioxidante por medio de la captación de radicales).
- A nivel crónico se concluye que el parámetro que mayor respuesta ha tenido ha sido la Superóxido Dismutasa (SOD) siendo el principal parámetro relacionado con el incremento en la Capacidad Antioxidante.
- Los niveles de Catalasa (CAT) se vieron incrementados en las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> en tratamientos con fullereno C<sub>60</sub>, pero en cantidades menores a SOD, se entiende que no todo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sigue la ruta de la CAT, pudiendo pasar por otras peroxidasas como la Glutación Peroxidasa, pero en menor cantidad.
- Existen otras características como la talla y el peso de *D. magna* que no han manifestado diferencias significativas, pero se concluye que la capacidad acumuladora de *D. magna* incrementa su peso por el exceso de

fulereno almacenado en el tracto digestivo, mientras que han presentado un decrecimiento en tamaño.

- La tasa intrínseca de reproducción se ha visto reducida en los tratamientos con fulereno C<sub>60</sub> con diferencias significativas con respecto a los controles. Este parámetro se encuentra relacionado a otros como el estrés oxidativo y el consumo correcto de alimentos, el cual se ve impedido por acumulación de fulereno C<sub>60</sub> en el tracto digestivo de *Daphnia magna*.
- El fulereno C<sub>60</sub> tiene efectos negativos a nivel multigeneracional en *Daphnia magna*, principalmente a nivel reproductivo y en estrés oxidativo, pero a concentraciones mayores en comparación a la literatura.

## RECOMENDACIONES

- La toxicidad del fulereno C<sub>60</sub> se incrementa de acuerdo al tiempo de preparado la solución del mismo, además del tipo de solvente a utilizar. Se recomienda siempre utilizar agua ultra pura, bidestilada o desionizada, para evitar algún tipo de interferencia que puedan alterar los resultados en ensayos ecotoxicológicos, como el uso de solventes orgánicos.
- A pesar que, el ensayo crónico por generación tuvo una duración de 15 días, se pueden realizar ensayos más prolongados (21 días según OECD) y evaluar más de una camada por generación. Esto nos permitirá ampliar el panorama a este nivel multigeneracional con resultados que puedan apoyar las conclusiones presentadas en este trabajo o contrastarlas y tener una mayor conclusión de efectos a nivel multigeneracional.
- Mantener los ensayos en oscuridad, debido a que se ha reportado que el fulereno pueda tener propiedades pro-oxidantes con exposición a la luz.
- El Software PROBIT 1.5 funciona bajo el Sistema Operativo Windows XP y versiones más antiguas, se puede solucionar el problema instalando un emulador de este sistema operativo o una computadora con este tipo de Windows.
- Existen otro tipo de parámetros que pueden evaluarse a manera de respuesta a corto y largo plazo como son los niveles de melanina, ingesta

de carbono total, enzimas como Peroxidasas, compuestos como el Glutathión, o daño a nivel genético.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, R., Toyota, K., Miyakawa, H., Watanabe, H., Oka, T., Miyagawa, H., Nishide, H., Uchiyama, I., Tollesfen, K., Iguchi, T. & Tatarazako. 2015. Diofenolan induces male offspring production through binding to the juvenile hormone receptor in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 159 (2015): 44 – 51.
- Aebi, H. 1974. Catalase. En Bergmeyer, *Methods of enzymatic analysis*. 671–84. Londres.
- Andrade, D., Souza, R., Santos, S., Andrade, D. 2005. Oxygen Free Radicals and pulmonary disease. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 31(1): 60-68.
- Alonso, M. 1996. Crustacea: Branchiopoda. En *Fauna Ibérica*. Madrid: CISC.
- An, R., Li, Y., Niu, X. & Yu, H. 2008. Responses of Antioxidant Enzymes in Catfish Exposed to Liquid Crystals from E-Waste. *Environmental Research and Public Health*. 5 (2): 99 – 103.
- Andrievsky, G., Bruskov, V., Tykhomyrov, A. & Gudkow, S. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of

hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 47 (2009): 786 – 793.

- Ardnt, D. 2014. Carbon Nanomaterials in Freshwater Ecosystems: A Chronic, Multi-generational, and Genomic Assessment of Toxicity to *Daphnia Magna*. Tesis Doctoral. Universidad de Wisconsin, Estados Unidos.
- Arzate-Cárdenas, M., Ortiz-Butrón, R. & Martínez-Jerónimo, F. 2011. Age effect on the antioxidant activity of *Daphnia magna* (Anomopoda: Daphniidae): Does younger mean more sensitivity? *Journal of Environmental Biology*. 32: 481-487.
- Avanasi, R., Jackson, W. A., Sherwin, B., Mudge, F., J., & Anderson, T. 2014. C<sub>60</sub> fullerene soil sorption, biodegradation, and plant uptake. *Environmental science & technology*.
- Barata, C., Damasio, J., López, M.A., Kuster, M. López De Alda, M., Barceló, D., Riva, M. & Raldúa, D. 2007. Combined use of biomarkers and in situ Bioassays in *Daphnia magna* to Monitor Environmental Hazards of Pesticides in the Field. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26 (2): 370–379.

- Baun, A., Sørensen, S., Rasmussen, R., Hartmann, N. & Koch, C. 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions aggregates of nano-C<sub>60</sub>. *Aquatic Toxicology*, 86, 379–387.
- Bhat, S. 2013. Ecotoxicology & Impact on Biodiversity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(2): 1-19.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Mortimer, M. & Kahru, A. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology*. 87: 1181-1200.
- Brand-Williams, W. C. & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technological*, 28:25-30.
- Burlaka, A., Sidorik, Y. Prylutska, S., Matyshevskaya, O., Golub, O. Prylyskyy, Y. & Scharff, P. 2014. Catalytic System of the Reactive Oxygen Species on the C<sub>60</sub> Fullerene Basis. *Experimental Oncology*. 26 (4): 326 -327.
- Campos, B. Jordao, R., Rivetti, C., Lemos, M., Soares, A., Tauler, R. & Barata, C. 2016. Two Generational Effects of Contaminants in

*Daphnia magna*: Effects of Offspring Quality. Environmental Toxicology and Chemistry. 35(6): 1470 – 1477.

- Cavalcanti, F., Abreu, J., Martins-Miranda, A., Almeida, R. & Gomes, J. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. New Phytologist. 163: 563 – 571.
- Chen, Y., Huang, J., Xing, L., Liu, H., Giesy, J., Yu, H. & Zhang, X. 2014. Effects of multigenerational exposures of *D. magna* to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol. Environmental Science Pollution Research. 21 (2014): 234 – 243.
- Coen, W. & Janssen, C. 1998. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. Hydrobiologia 367: 199-209.
- Coen, W., Janssen, C., & Segner, H. 2001. The Use of Biomarkers in *Daphnia magna* Toxicity Testing V. In Vivo Alterations in the Carbohydrate Metabolism of *Daphnia magna* Exposed to Sublethal Concentrations of Mercury and Lindane. Ecotoxicology and Environmental Safety 48: 223-234.
- Colvin, V. 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. Nature Biotechnology, 21 (10): 1166 - 1170.

- Cowgill, U., Williams, D. & Esquivel, B. 1984. Effects of Maternal Nutrition on Fat Content and Longevity of Neonates of *Daphnia magna*. *Journal of Crustacean Biology*. 4 (2): 173 – 190.
- Dal Forno, G., Kist, L., De Azevedo, M., Fritsch, R., Pereira, T., Britto, R., Guterres, S., Kulkamp-Guerreiro, I., Bonan, C., Monserrat, J.M. & Bogo M. 2013. Intraperitoneal Exposure to Nano/Microparticles of Fullerene Increases Acetylcholinesterase Activity and Lipid Peroxidation in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. *Biomedical Research International*.
- Damásio, J., Tauler, R., Teixidó, E., Reiradevall, M. Prat, N., Riva, M., Soares, A. & Barata, C. 2008. Combined use of *Daphnia magna* in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). *Aquatic Toxicology* 87: 310–320.
- Dave, G. 1984. Effects of Copper on Growth, Reproduction, Survival and Haemoglobin in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 78 (2): 439-443.

- De La Monte, S. 2011. Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets. InTech. 1era Edición. Estados Unidos.
- Dey, S., Dey, J., Patra, S. & Pothal, D. 2007. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress.
- Dieter, E. 2005. Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. National Center for Biotechnology Information. Estados Unidos.
- Dimitrova, M., Tsinova V. & Velcheva, V. 1994. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology.108:43 –46.
- Elias-Letts, R., Pereira, T., Reis, M., & Monserrat, J. M. 2010. Biologic Responses of Bacteria Communities Living at the Mucus Secretion of Common Carp (*Cyprinus carpio*) After Exposure to the Carbon Nanomaterial Fullerene (C<sub>60</sub>). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 61(2): 311-317.

- Fan, W., Tang, G., Zhao, C., Duan, Y. & Zang, R. 2009. Metal Accumulation and Biomarker Responses in *Daphnia magna* Following Cadmium and Zinc Exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28 (2): 305 – 310.
- Fan, W., Cui, M., Shi, Z., Tan, C. & Yang, P. 2012. Enhanced Oxidative Stress and Physiological Damage in *Daphnia magna* by Copper in the Presence of Nano-TiO<sub>2</sub>. *Journal of Nanomaterials*. 2012(1): 1-7.
- Fortner, J., Lyon, D., Sayes, C., Boyd, A., Falkner, J., Hotze, E., Alemany, L.B., Tao, Y.J., Guo, W., Ausman, K.D., Colvin, V.L. & Hughes J.B. 2005. C<sub>60</sub> in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environmental Science and Technology*, 39 (11), 4307-16.
- Fujita, K., Morimoto, Y., Ogami, A., Myojyo, T., Tanaka, I., Shimada, M., Wang, W., Endoh, S., Uchida, K., Nakazato, T., Yamamoto, K., Fukui, H., Horie, M., Yoshida, Y., Iwahashi, H. & Nakanishi, J. 2009. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C<sub>60</sub> fullerene particles. *Toxicology*. 258(1): 47-55.

- Gaete, H. & Chávez, C. 2008. Evaluación de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). *Limnética*. 27: 1-10.
- Gao, J., Youn, S., Hovsepyan, A., Llaneza, V., Wang, Y., Bitton, G. & Bonzongo, J. 2009. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. *Environmental Science and Technology*. 43(9): 3322-3328.
- Gharbi, N., Pressac, M., Hadchouel, M., Szwarc, H., Wilson, S. & Moussa, F. 2005. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Letters*. 5: 2578-2585.
- Gómez-Oliván. L., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., San Juan-Reyes, N. 2014. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 164 (2014): 21-26.
- González, Y. & Aportela, P. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología* 2001. 1: 104-108.

- Gorski, P. & Dodson, S. 1996. Free Swimming *Daphnia pulex* can avoid following Stokes' Law. 1996. Limnology and Oceanography. 41(8): 1815 – 1821.
- Gopi, R.A., Ayyappan, S., Chandrasehar, G., Krishna Varma, K. & Goparaju, A. 2012. Effect of Potassium Dichromate on the Survival and Reproduction of *Daphnia magna*. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences. 1(7), 89-94.
- Gregus Z. & Klaassen, C. 2001. Manual de Toxicología. 5ta Edición. Mc Graw Hill, México.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. 1999. Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press. 3era Edición. Estados Unidos.
- Hammers-Wirtz, M. & Ratte, H. T. 2000. Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? Environmental Toxicology and Chemistry (19), 1856–1866.
- Hangsber, W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Instituto de Fisiología Celular: Universidad Autónoma de México.

- Heckmann, L., Callaghan, A., Hooper, H., Connon, R., Hutchinson, T., Maund, S. & Sibly, R. 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters* 172 (2007): 137 – 145.
- Henry, T., Menn, F., Fleming, J., Wilgus, J., Compton, R., & Sayler, G. 2007. Attributing effects of aqueous C<sub>60</sub> nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environmental Health Perspect.* 115, 1057-1065.
- Herbert, I., Svendsen, C., Hankard, P. & Spurgeon, D. 2004. Comparison of instantaneous rate of population increase and critical-effect estimates in *Folsomia candida* exposed to four toxicants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57 (2004): 175–183.
- Hoang, T. & Klaine, S. 2007. Influence of Organism Age on Metal Toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26 (6): 1198 – 1204.
- Iannaccone, J. & Alvarino, L. 2002. Efecto del detergente doméstico alquil aril sulfonato de sodio lineal (LAS) sobre la mortalidad de tres caracoles dulceacuícolas en el Perú. *Ecología Aplicada* 1: 81-87.

- Iannacone, J. & Alvariño, L. 2007. Ecotoxicidad Acuática de dos colorantes y de tres antiparazitarios de importancia en acuicultura en *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*. 6(1, 2): 101-110.
- Isaacson, C. & Bouchard, D. 2010. Effects of Humic Acid and Sunlight on the Generation and Aggregation State of Aqu/C60 Nanoparticles. *Environmental Science and Technology*. 44: 8971-8976.
- Johnston, H., Hutchinson, G., Christensen, F., Aschberger, K. & Stone, V. 2010. The Biological Mechanism and Physicochemical Characteristics Responsible for Driving Fullerene Toxicity. *Toxicological Sciences* 114 (2): 162 – 182.
- Jonanovic, B. 2011. Immunotoxicology of titanium dioxide and hydroxylated fullerenes engineered nanoparticles in fish models. Tesis Doctoral. Iowa State University, Estados Unidos.
- Jurzuk, M., Brzóka, M. Moniuszko-Jakoniuk, J., Galazyn-Sidorczuk, M. & Kulikowska-Karpinska, E. 2003. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and Chemical Toxicology*. 42 (2004): 429 – 438.

- Karadag, H., Firat, Ö. & Firat, Ö. 2014. Use of Oxidative Stress Biomarkers in *Cyprinus carpio* L. for the Evaluation of Water Pollution in Ataturk Dam Lake (Adiyaman, Turkey).
- Kamat, J., Devasagayam, T., Priyadarsini, K. & Mohan, H. 2000. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology*. 155: 55-61. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19 (1): 53- 60.
- Kamaya, Y., Tokita, N. & Suzuki, K. 2005. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 61 (2005): 83 – 88.
- Kashian, D. & Dodson, S. 2002. Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. *Toxicology and Industrial Health*.18: 225-235.
- Klaine, S., Alvarez, P., Batley, G., Fernandes, T., Handy, R., Lyon, D., Mahendra, S., Mclaughlin, M. & Lead, J. 2008. Nanomaterials in the Environment: Behavior, fate, bioavailability and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(9): 1825 – 1851.

- Kong, L. & Zepp, R. 2012. Production and Consumption of Reactive Oxygen Species by Fullerenes. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31 (1): 136-146.
- Kroto, H., Heath, J., O'brien, S., Curl, R. & Smalley, E. 1985. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. *Nature*. 318: 162-163.
- Lee, J., Yamakoshi, Y., Hughes, J. & Kim, J. 2008. Mechanism of C<sub>60</sub> Photoreactivity in Water: Fate of Triplet State and Radical Anion and Production of Reactive Oxygen Species. *Environmental Science and Technology*. 42: 3459-3464.
- Lopes, I. Baird, D. & Ribeiro, R. 2004. Avoidance of Copper Contamination by Field Populations of *Daphnia longispina*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23 (7): 1702–1708
- Lovern, S., & Klaper, R. 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C<sub>60</sub>) nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1132-1137.
- Lovern, S. Stricker, J. & Klaper, R. 2007. Changes in *Daphnia magna* when exposed to Nanoparticle Suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C<sub>60</sub> and C<sub>60</sub>HxC<sub>70</sub>Hx). *Environmental Science and Technology*. 41: 4465 – 4470.

- Lu, G., Liu, J., Sun, L. & Yuan, L. 2015. Toxicity of perfluorononanoic acid and perfluorooctane sulfonate to *Daphnia magna*. *Water Science and Engineering*. 8(1): 1-7.
- Manar, R., Bessi, H. & Vasseur, P. 2009. Reproductive effects and Bioaccumulation of Chlordane in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28 (10): 2150–2159.
- Markovic, Z. & Trajkovic, V. 2008. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C<sub>60</sub>). *Biomaterials* 29 (2008): 3561 – 3573.
- Mashino, T., Nishikawa, D., Takahashi, K., Usui, N., Yamori, T., Seki, M., Endo, T. & Mochizuki M. 2003. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, 13(24):4395-7.
- Matsumoto, T., Ikuno, E. Shiro, I. & Sugita, H. 2008. Chemical sensitivity of the male daphnid, *Daphnia magna*, induced by exposure to juvenile hormone and its analogs. *Chemosphere* 72 (2008): 451 – 456.

- McCord, J. & Fridovich, I. 1969. Enzymic Function for Erythrocytchrome c (Hemocytchrome c)\*. *Journal of Biological Chemistry.*, 244 (22): 6049 – 6055.
- Misra, H. & Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry.* , 247 (10), 3170-5.
- Muysen, B. & Janssen, C. 2001. Multigeneration Zinc Acclimation and Tolerance in *Daphnia magna* Implications for Water-Quality Guidelines and Ecological Risk Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 20(9): 2053-2060.
- Muysen, B. & Janssen, C. 2007. Age and exposure duration as a factor influencing Cu and Zn toxicity toward *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68 (2007): 436–442.
- Nuñez, M. & Hurtado, J. 2005. Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. *Revista Peruana de Biología.* 12(1): 165-170.

- Oberdörster, E. 2004b. Toxicity of nC<sub>60</sub> fullerenes to two aquatic species: *Daphnia* and largemouth bass. In: 227th American Chemical Society National Meeting.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*. 113 (7): 823–839.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilization Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2012. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2.
- Patlolla, A., Barnes, C., Yedjou, C., Velma, V. & Tchunwou, P. 2009. Oxidative Stress, DNA Damage, and Antioxidant Enzyme Activity Induced by Hexavalent Chromium in Sprague-Dawley Rats. *Environmental Toxicology*. 24 (1): 66-73.
- Pattanaik, N., Singh, A., Pandey, R., Singh, B., Kumar, M., Dixit, S. & Tripathi, Y. 2003. Toxicology and Free Radicals scavenging

property of Tamra Bhasma. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 18 (2): 181 – 189.

- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B & Raisuddin, S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). The Science of the Total Environment 309 (2003): 105–115.
- Piccino, F., Gottschalk, F., Seeger, S. & Bernd, N., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. Journal of Nanoparticles Research. 14: 1109-1119.
- Pradhan, N., Singh, S., Ojha, N., Shrivastava, A., Barla, A. Rai, V. & Bose, S. 2015. Facets of Nanotechnology as Seen in Food Processing, Packaging, and Preservation Industry. Biomedical Research International. 2015: 1-18.
- Regoli, F., Gorbi, S., Freznilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S. & Winston, G. 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. Marine Environmental Research 54 (2002): 419-423.

- Roberts, A. Mount, A., Seda, B., Souther, J., Qiao, R., Lin, S. Chun Ke, P., Rao, A. & Klaine, S. 2007. *In vivo* Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Technology*. 41: 3025–3029.
- Ruppert, E. E. & Barnes, R. D. 1996. *Zoología de los Invertebrados*. McGraw - Hill Interamericana. México.
- Sánchez, M. 2006. Alteraciones Fisiológicas como consecuencia de la Exposición a Plaguicidas en Sucesivas Generaciones de *Daphnia magna*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.
- Saliu, J., Bawa-Allah, K. 2012. Toxicological Effects of Lead and Zinc on the Antioxidant Enzyme Activities of Post Juvenile *Clarias gariepinus*. *Resources and Environment*. 2(1): 21- 26.
- Sarma, S. & Nandini, S. 2006. Review of Recent Ecotoxicological Studies on Cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 41 (8): 1417-1430.
- Sayes, C., Fortner, J., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A., Ausmann, K. Tao, Y., Sitharaman, B., Wilson, L. & Hughes, J. 2004. The

Differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. Nano Letters 4: 1881-1887.

- Sayes, C., Gobin, A., Ausman, K., Mendez, J., West, J., & Colvin, V. 2005. Nano-C<sub>60</sub> cytotoxicity is due to lipid peroxidation. Biomaterials, 26 (36), 7587-7595.
- Scandalios, J. 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. Plant Physiology. 101: 7 – 12.
- Sikka, S. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Current Medicinal Chemistry, 8 (7), 851-62.
- Stark, J. & Vargas, R. 2005. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 62 (2005): 11 – 16.
- Tao, X. Fortner, J., Zhang, B., He, Y., Chen, Y. & Hughes, J. 2009. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystals (nC<sub>60</sub>) on *Daphnia magna*: Evaluation of sub-lethal reproductive responses and accumulation. Chemosphere 77 (2009): 1482-1487.
- Tao, X., He, Y., Zhang, B., Chen, Y. & Hughes, J. 2011. Effects of stable aqueous fullerene nanocrystal (nC<sub>60</sub>) on *Daphnia magna*:

Evaluation of hop frequency and accumulations under different conditions. *Journal of Environmental Sciences*, 23 (2), 322-329.

- Tao, X., Li, C., Zhang, B., & He, Y. 2016. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystals (nC<sub>60</sub>) on the food conversion from *Daphnia magna* to *Danio rerio* in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere* 145 (2016): 157 – 162.

Tervonen, K., Waissi, G., Petersen, E., Akkanen, J. & Kukkonen, J. 2010. Analysis of Fullerene-C<sub>60</sub> and Kinetic Measurements for its Accumulation and Depuration in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(5): 1072-1078.

- Trajkovic, S., Dobric, S. Jacevic, V., Dragojevic-Simic, V., Milovanovic, Z. & Dordevic, A. 2007. Tissue-protective effects of fulleranol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> and amifostine in irradiated rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58: 39-43
- Ulloa, E. 2013. Fullerenes and their Applications in Science and Technology. Versión web en: [web.eng.fiu.edu/~vlassov/EEE-5425/Ulloa-Fullerenes.pdf](http://web.eng.fiu.edu/~vlassov/EEE-5425/Ulloa-Fullerenes.pdf). Visitado el 12-11-2016.

- US.EPA (United States Environmental Protection Agency). 1996. Ecological Effects Guidelines. OPPTS 850.1300 Daphnid Chronic Toxicity Test.
- US.EPA (United States Environmental Protection Agency). 2007. Nanotechnology White Paper.
- Valdés, A. 2009. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*. Tesis de Maestría en Ciencias Químico-biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Vásquez, D., 2014. Efectos del Fullereno C<sub>60</sub> y Cobre Mediados por Luz Uv-Vis en *Daphnia magna* en Condiciones de Laboratorio. Tesis de Pregrado. Perú.
- Villarroel, J. 2004. Alteraciones Fisiológicas en el crustáceo *Daphnia magna* por exposición a plaguicidas. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.
- Volkér, C., Boedicker, C., Daubenthaler, J., Oetken, M. & Oehlmann, J. 2013. Comparative Toxicity Assessment of Nanosilver on Three *Daphnia* Species in Acute, Chronic and Multi-Generation Experiments. PLOS ONE. 8 (10): 1 – 10.

- Walker, C., Sibly, R., Hopkin, S. & Peakall, D. 2012. Principles of Ecotoxicology. CRC Press Taylor & Francis Group. 4ta Edición. Estados Unidos.
- Waterman, 1961. The Physiology of Crustacea. Academic Press New York. Estados Unidos.
- Wu, H, Xu, H., Hong, Y., Zhang, J. & Wu, J. 2011. The use of biomarkers in the antioxidant responses of *Daphnia magna* to the acute and chronic exposure to No. 20 diesel oil and 2,4-dichlorophenol. Chemical Speciation and Bioavailability. 23(2): 80-87.
- Yadav, B. & Kumar, R. 2008. Structure, properties and applications of fullerenes. International Journal of Nanotechnology and Applications 1(2):15 -24.
- Yamakoshi, Y., Umezawa, N., Ryu, A., Arakane, K., Miyata, N., Goda, Y. Masumizu, T. & Nagano, T. 2003. Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C<sub>60</sub>) as Potential Medicines: O<sup>2•-</sup> versus <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Journal of American Chemical Society. 125: 12803 – 12809.

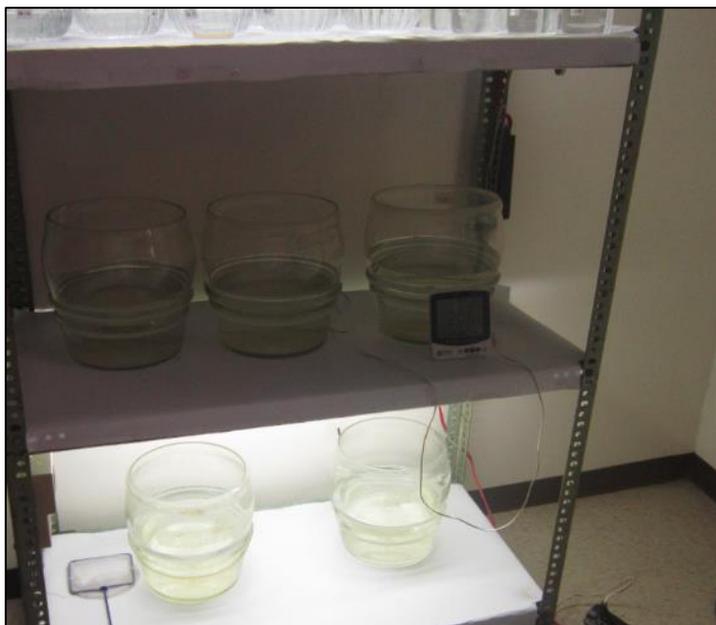
- Yeardeley, R, Lazorchak, J. & Gast, L. 1996. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15:1532-1537.
- Yin, J., Lao, F., Fu, P., Wamer, W., Zhao, Y., Wang, P., Qiu, Y., Sun, B., Xing & Dong, J. 2009. The scavenging of reactive oxygen species and the potential of cell protection by functionalised fullerene materials. *Biomaterials* 30: 611-612.
- Zhao, C. & Wang, W. 2011. Comparison of Acute and Chronic Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(4): 885-892.
- Zhu, S., Oberdörster, E. & Haasch, M. 2006. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Marine Environmental Research*, 62 Suppl: S5-9.
- Zhu, X. S., Chang, Y., & Chen, Y. S. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 78(3): 209-215

- Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y. & Tian, S. 2009. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 65-75.
- Zhu, X., Zhu, L., Lang, Y. & Chen, Y. 2008. Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates. *Environmental Toxicology Chemistry*, 1979-85.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1: REPORTE FOTOGRÁFICO

### A. Instalaciones para el Medio de Cultivo de *Daphnia magna* y ensayos



(1)



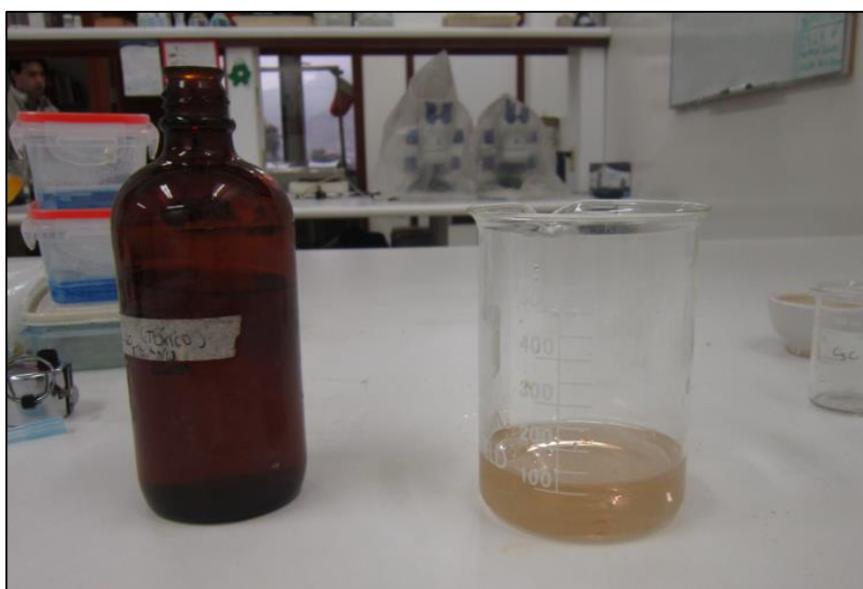
(2)

**Fotografía 1.** Instalación de los medios de cultivo de *Daphnia magna* en el laboratorio. Se puede apreciar el uso de iluminación para mantenerlas en fotoperiodo. **Fotografía 2.** Instalación de ensayos de toxicidad en el laboratorio.

## B. Preparación de Solución de Fullereno



(3)



(4)

**Fotografía 3.** Filtrado de soluciones del Fullereno  $C_{60}$  luego de pasar por el proceso de agitación. **Fotografía 4.** Almacenamiento final de soluciones de fullereno en frascos ámbar para evitar su contacto con la luz.

### C. Ensayos de Toxicidad Aguda



(5)



(6)



(7)



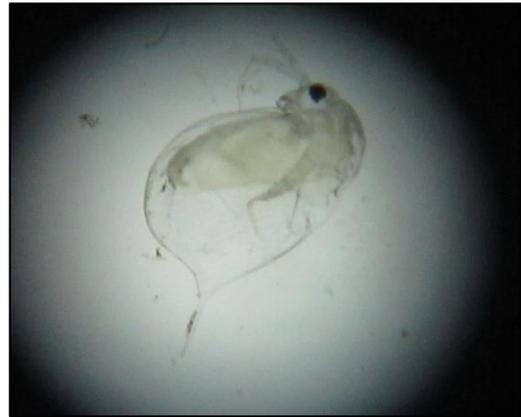
(8)

**Fotografía 5.** *Daphnia magna* en ensayo de toxicidad por fullereno C<sub>60</sub> a 48 h. Control negativo. **Fotografías 6, 7 y 8.** *Daphnia magna* en exposición al fullereno C<sub>60</sub> a 48 h a concentraciones de 50, 80 y 150 mg/L respectivamente.

## D. Ensayos de Toxicidad Crónica



(9)



(10)



(11)



(12)



(13)

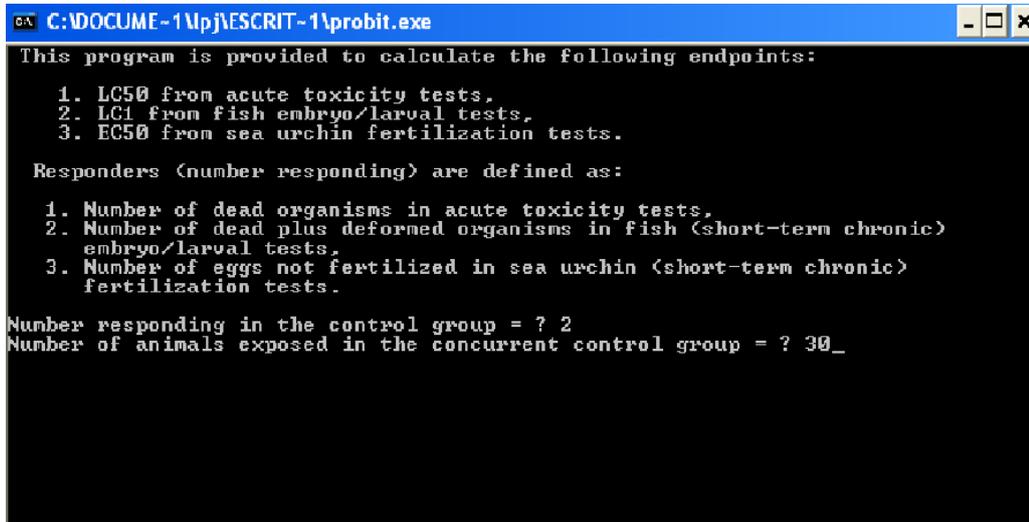


(14)

**Fotografías del ensayo de toxicidad crónico de fulereno  $C_{60}$  en *Daphnia magna*.** (9) y (10). Parentales  $F_0$ : Control y con tratamiento respectivamente. (11) y (12). Generación  $F_1$ : Control y con tratamiento respectivamente. (13) y (14). Generación  $F_2$ : Control y con tratamiento respectivamente.

## ANEXO 2: RESULTADOS OBTENIDOS POR SOFTWARE PROBIT 1.5

Figura 16. Funciones del programa PROBIT de la US.EPA e introducción de datos en los controles.

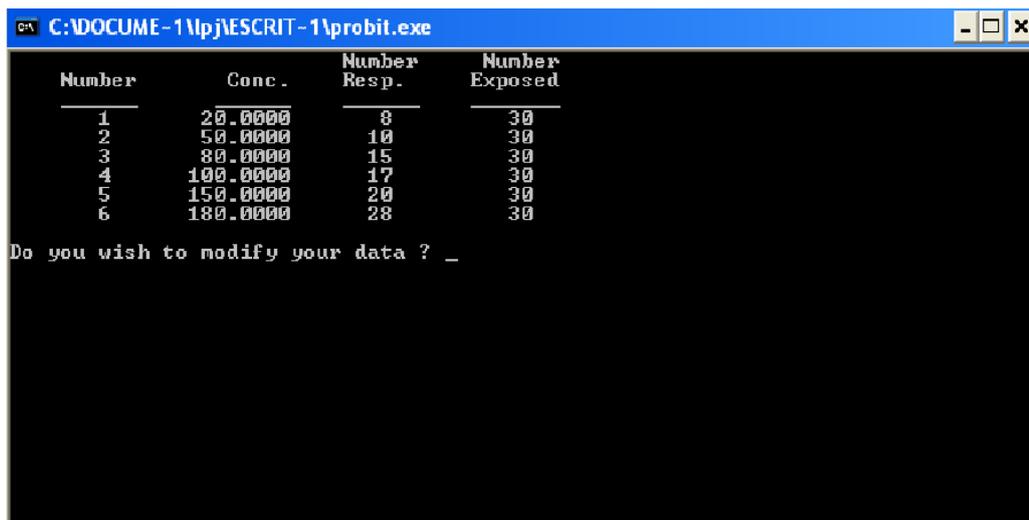


```
C:\DOCUME-1\pjj\ESCRIT-1\probit.exe
This program is provided to calculate the following endpoints:
1. LC50 from acute toxicity tests,
2. LC1 from fish embryo/larval tests,
3. EC50 from sea urchin fertilization tests.

Responders (number responding) are defined as:
1. Number of dead organisms in acute toxicity tests,
2. Number of dead plus deformed organisms in fish (short-term chronic)
   embryo/larval tests,
3. Number of eggs not fertilized in sea urchin (short-term chronic)
   fertilization tests.

Number responding in the control group = ? 2
Number of animals exposed in the concurrent control group = ? 30_
```

Figura 17. Introducción de datos de respuesta en las concentraciones y confirmación.



```
C:\DOCUME-1\pjj\ESCRIT-1\probit.exe
```

Number	Conc.	Number Resp.	Number Exposed
1	20.0000	8	30
2	50.0000	10	30
3	80.0000	15	30
4	100.0000	17	30
5	150.0000	20	30
6	180.0000	28	30

```
Do you wish to modify your data ? _
```

**Figura 18. Resultados obtenidos con PROBIT 1.5**

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM  
 USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES  
 Version 1.5

CL50 FULERENO

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
Control	30	2	0.0667	0.0000	0.0950
20.0000	30	8	0.2667	0.1897	0.0901
50.0000	30	10	0.3333	0.2634	0.3193
80.0000	30	15	0.5000	0.4475	0.4909
100.0000	30	17	0.5667	0.5212	0.5750
150.0000	30	20	0.6667	0.6317	0.7172
180.0000	30	28	0.9333	0.9263	0.7727

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 6.983  
 Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level) = 9.488

Mu = 1.913561  
 Sigma = 0.457008

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	0.812851	1.007627	( -1.162098,	2.787799)
Slope	2.188145	0.507279	( 1.193879,	3.182411)
Spontaneous Response Rate	0.094982	0.051569	( -0.006092,	0.196056)

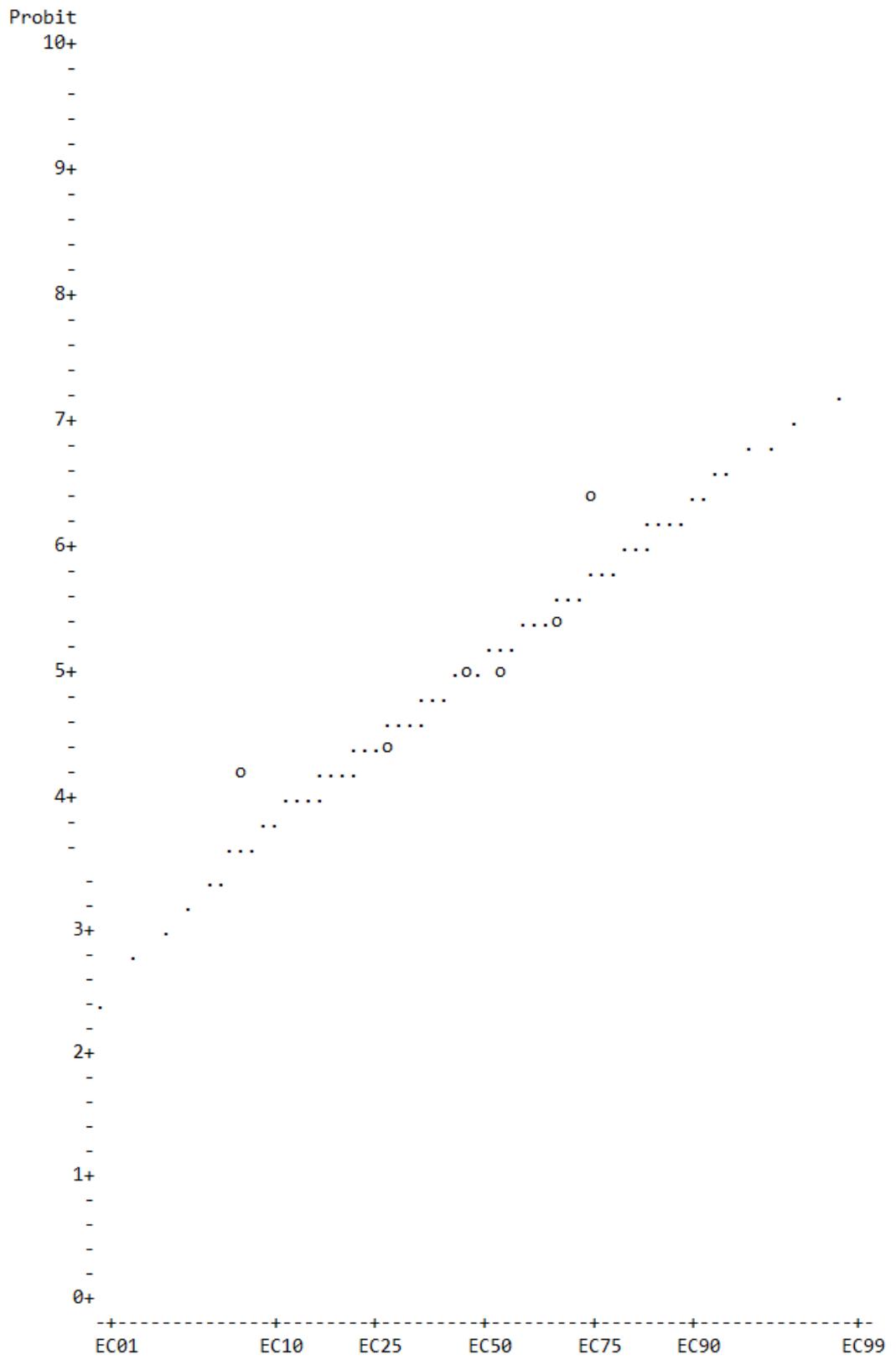
CL50 FULERENO

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	7.086	0.707	17.155
LC/EC 5.00	14.515	2.602	28.387
LC/EC 10.00	21.275	5.195	37.264
LC/EC 15.00	27.537	8.262	44.895
LC/EC 50.00	81.952	53.568	108.183
LC/EC 85.00	243.896	172.307	525.437
LC/EC 90.00	315.692	209.966	826.239
LC/EC 95.00	462.694	278.151	1634.688
LC/EC 99.00	947.763	463.710	5974.862

‡  
 CL50 FULERENO

PLOT OF ADJUSTED PROBITS AND PREDICTED REGRESSION LINE



## ANEXO 3: RESULTADOS OBTENIDOS POR SOFTWARE SPSS 24

### A. Ensayos de Toxicidad Aguda

#### Mortalidad

##### Unidireccional

##### ANOVA

Mortalidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14580,952	6	2430,159	34,022	,000
Dentro de grupos	1000,000	14	71,429		
Total	15580,952	20			

##### Subconjuntos homogéneos

##### Mortalidad

HSD Tukey<sup>a</sup>

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
,00	3	6,6667				
20,00	3	26,6667	26,6667			
50,00	3		33,3333	33,3333		
80,00	3		50,0000	50,0000	50,0000	
100,00	3			56,6667	56,6667	
150,00	3				66,6667	
180,00	3					93,3333
Sig.		,122	,053	,053	,261	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

#### Salto

##### ANOVA

Salto					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3659,911	5	731,982	90,393	,000
Dentro de grupos	97,173	12	8,098		
Total	3757,084	17			

##### Subconjuntos homogéneos

##### Salto

HSD Tukey<sup>a</sup>

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
,00	3	67,6000				
20,00	3		81,3333			
50,00	3		83,8667	83,8667		
80,00	3			89,4667	89,4667	
100,00	3				97,0667	
150,00	3					113,7333
Sig.		1,000	,876	,227	,058	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

## Capacidad Antioxidante

### Unidireccional

#### ANOVA

Capacidad Antioxidante

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7537,682	5	1507,536	3509,889	,000
Dentro de grupos	5,154	12	,430		
Total	7542,836	17			

### Subconjuntos homogéneos

#### Capacidad Antioxidante

HSD Tukey<sup>a</sup>

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
,00	3	32,8267					
20,00	3		42,3500				
50,00	3			46,0000			
80,00	3				61,1900		
100,00	3					72,3033	
150,00	3						93,7100
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

## B. Ensayos de Toxicidad Crónica Multigeneracional

### Tallas

#### Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Talla

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,536 <sup>a</sup>	5	,107	2,000	,115
Intersección	111,803	1	111,803	2087,682	,000
Generación	,384	2	,192	3,583	,043
Tratamiento	,035	1	,035	,662	,424
Generación * Tratamiento	,061	2	,030	,568	,574
Error	1,285	24	,054		
Total	143,176	30			
Total corregido	1,821	29			

a. R al cuadrado = ,294 (R al cuadrado ajustada = ,147)

## Pruebas post hoc

### Generación

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Talla

	(I) Generación	(J) Generación	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	F0	F1	-,3206	,13361	,061	-,6543	,0130
		F2	-,0580	,10909	,857	-,3305	,2144
	F1	F0	,3206	,13361	,061	-,0130	,6543
		F2	,2626	,10909	,060	-,0098	,5350
	F2	F0	,0580	,10909	,857	-,2144	,3305
		F1	-,2626	,10909	,060	-,5350	,0098
T de Dunnett (bilateral) <sup>a</sup>	F0	F2	-,0580	,10909	,833	-,3169	,2009
	F1	F2	,2626*	,10909	,046	,0037	,5215

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,054.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

### Subconjuntos homogéneos

#### Talla

	Generación	N	Subconjunto	
			1	2
HSD Tukey <sup>a,b,c</sup>	F0	6	2,0717	
	F2	18	2,1298	2,1298
	F1	6		2,3924
	Sig.		,876	,087
Duncan <sup>a,b,c</sup>	F0	6	2,0717	
	F2	18	2,1298	
	F1	6		2,3924
	Sig.		,627	1,000

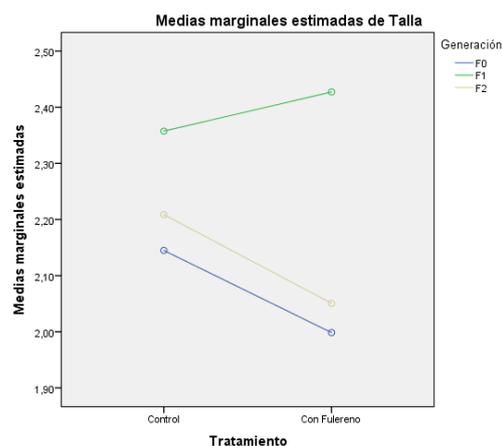
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,054.

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 7,714.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.
- Alfa = 0.05.

#### Gráficos de perfil



## Pesos

#### Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Peso

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,148 <sup>a</sup>	5	,230	6,661	,001
Intersección	35,744	1	35,744	1037,229	,000
Generación	,108	2	,054	1,572	,228
Tratamiento	,064	1	,064	1,871	,184
Generación * Tratamiento	,624	2	,312	9,053	,001
Error	,827	24	,034		
Total	50,184	30			
Total corregido	1,975	29			

a. R al cuadrado = ,581 (R al cuadrado ajustada = ,494)

## Pruebas post hoc

### Generación

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Peso

	(I) Generación	(J) Generación	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	F0	F1	-,1233	,10718	,493	-,3910	,1443
		F2	-,1550	,08751	,201	-,3735	,0635
	F1	F0	,1233	,10718	,493	-,1443	,3910
		F2	-,0317	,08751	,931	-,2502	,1869
	F2	F0	,1550	,08751	,201	-,0635	,3735
		F1	,0317	,08751	,931	-,1869	,2502
T de Dunnett (bilateral) <sup>a</sup>	F0	F2	-,1550	,08751	,165	-,3627	,0527
	F1	F2	-,0317	,08751	,918	-,2393	,1760

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,034.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

## Subconjuntos homogéneos

### Peso

	Generación	N	Subconjunto	
			1	
HSD Tukey <sup>a,b,c</sup>	F0	6	1,1500	
	F1	6	1,2733	
	F2	18	1,3050	
	Sig.			,249
Duncan <sup>a,b,c</sup>	F0	6	1,1500	
	F1	6	1,2733	
	F2	18	1,3050	
	Sig.			,133

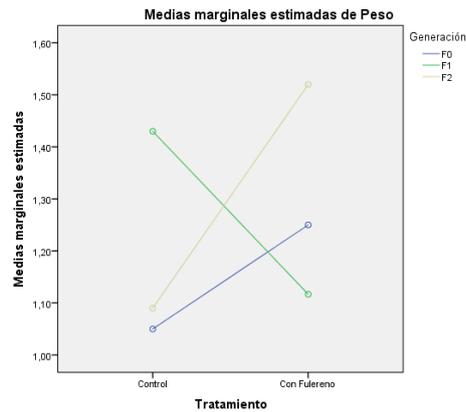
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,034.

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 7,714.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.
- Alfa = 0,05.

#### Gráficos de perfil



## Catalasa - CAT

### Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Catalasa

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	25,145 <sup>a</sup>	5	5,029	6,478	,001
Intersección	18,838	1	18,838	24,268	,000
Generación	3,744	2	1,872	2,411	,111
Tratamiento	14,702	1	14,702	18,940	,000
Generación * Tratamiento	2,297	2	1,148	1,480	,248
Error	18,630	24	,776		
Total	66,691	30			
Total corregido	43,775	29			

a. R al cuadrado = ,574 (R al cuadrado ajustada = ,486)

## Pruebas post hoc

### Generación

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Catalasa

	(I) Generación	(J) Generación	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	F0	F1	1,1050	,50868	,097	-,1653	2,3753
		F2	,6583	,41533	,271	-,3789	1,6955
	F1	F0	-1,1050	,50868	,097	-2,3753	,1653
		F2	-,4467	,41533	,538	-1,4839	,5905
	F2	F0	-,6583	,41533	,271	-1,6955	,3789
		F1	,4467	,41533	,538	-,5905	1,4839
T de Dunnett (bilateral) <sup>a</sup>	F0	F2	,6583	,41533	,229	-,3273	1,6440
	F1	F2	-,4467	,41533	,488	-1,4323	,5390

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,776.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

### Subconjuntos homogéneos

#### Catalasa

	Generación	N	Subconjunto	
			1	2
HSD Tukey <sup>a,b,c</sup>	F1	6	,3850	
	F2	18	,8317	
	F0	6	1,4900	
	Sig.		,054	
Duncan <sup>a,b,c</sup>	F1	6	,3850	
	F2	18	,8317	,8317
	F0	6		1,4900
	Sig.		,329	,155

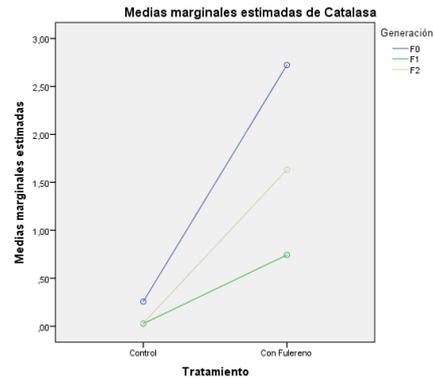
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,776.

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 7,714.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.
- Alfa = 0.05.

#### Gráficos de perfil



## Superóxido Dismutasa - SOD

#### Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: SOD

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	155,841 <sup>a</sup>	5	31,168	51,238	,000
Intersección	292,750	1	292,750	481,259	,000
Tratamiento	77,371	1	77,371	127,192	,000
Generación	37,835	2	18,917	31,099	,000
Tratamiento * Generación	22,371	2	11,186	18,388	,000
Error	20,682	34	,608		
Total	581,083	40			
Total corregido	176,523	39			

a. R al cuadrado = ,883 (R al cuadrado ajustada = ,866)

## Pruebas post hoc

### Generacion

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: SOD

	(I) Generacion	(J) Generacion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	F0	F1	3,0200 <sup>a</sup>	,38997	,000	2,0644	3,9756
		F2	1,1346 <sup>a</sup>	,31841	,003	,3543	1,9148
	F1	F0	-3,0200 <sup>a</sup>	,38997	,000	-3,9756	-2,0644
		F2	-1,8854 <sup>a</sup>	,31841	,000	-2,6657	-1,1052
	F2	F0	-1,1346 <sup>a</sup>	,31841	,003	-1,9148	-,3543
		F1	1,8854 <sup>a</sup>	,31841	,000	1,1052	2,6657
T de Dunnett (bilateral) <sup>b</sup>	F0	F2	1,1346 <sup>a</sup>	,31841	,002	,3928	1,8764
	F1	F2	-1,8854 <sup>a</sup>	,31841	,000	-2,6272	-1,1436

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,608.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

b. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

### Subconjuntos homogéneos

		SOD				
		Generacion	N	Subconjunto		
				1	2	3
HSD Tukey <sup>a,b,c</sup>	F1		8	1,4450		
	F2		24		3,3304	
	F0		8			4,4650
	Sig.			1,000	1,000	1,000
Duncan <sup>a,b,c</sup>	F1		8	1,4450		
	F2		24		3,3304	
	F0		8			4,4650
	Sig.			1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

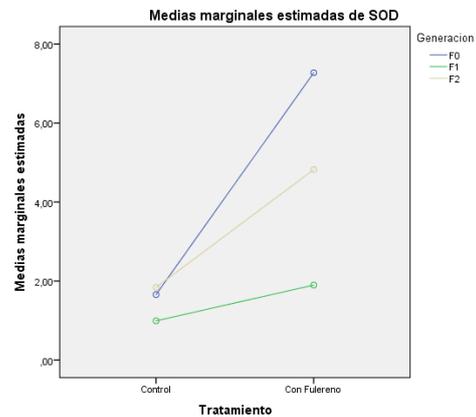
El término de error es la media cuadrática(Error) = ,608.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,286.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Alfa = 0.05.

### Gráficos de perfil



## Tasa Intrínseca de Reproducción

### Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tasa Intr. de Rep.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,005 <sup>a</sup>	5	,001	13,869	,000
Intersección	,369	1	,369	4690,326	,000
Generación	,001	2	,000	3,614	,042
Tratamiento	,005	1	,005	58,245	,000
Generación * Tratamiento	,001	2	,000	3,614	,042
Error	,002	24	7,870E-5		
Total	,474	30			
Total corregido	,007	29			

a. R al cuadrado = ,743 (R al cuadrado ajustada = ,689)

## Pruebas post hoc

### Generación

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Tasa Intr. de Rep.

	(I) Generación	(J) Generación	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	F0	F1	,0100	,00512	,146	-,0028	,0228
		F2	,0111*	,00418	,036	,0007	,0216
	F1	F0	-,0100	,00512	,146	-,0228	,0028
		F2	,0011	,00418	,962	-,0093	,0116
	F2	F0	-,0111*	,00418	,036	-,0216	-,0007
		F1	-,0011	,00418	,962	-,0116	,0093
T de Dunnett (bilateral) <sup>b</sup>	F0	F2	,0111*	,00418	,027	,0012	,0210
	F1	F2	,0011	,00418	,955	-,0088	,0110

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 7,870E-5.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

b. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

### Subconjuntos homogéneos

#### Tasa Intr. de Rep.

	Generación	N	Subconjunto	
			1	2
HSD Tukey <sup>a,b,c</sup>	F2	18	,1222	
	F1	6	,1233	
	F0	6	,1333	
	Sig.		,054	
Duncan <sup>a,b,c</sup>	F2	18	,1222	
	F1	6	,1233	
	F0	6		,1333
	Sig.		,808	1,000

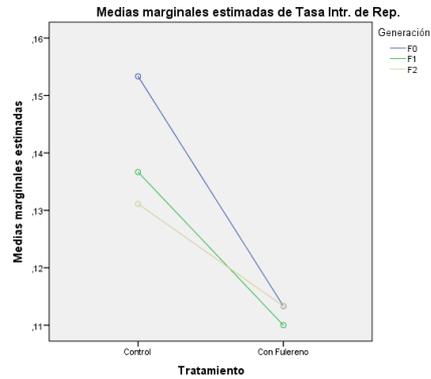
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 7,870E-5.

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 7,714.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.
- Alfa = 0.05.

#### Gráficos de perfil



## ANEXO 4: HOJA DE SEGURIDAD DEL FULERENO

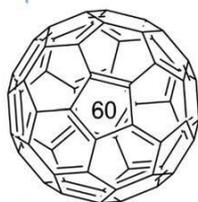
### Fullerene-C<sub>60</sub> - Datasheet

> 99.5%

Synonym: Buckminsterfullerene

#### Properties

Product Name:	Fullerene Carbon 60 (C60)
Purity offer (HPLC): UV wavelength 320nm	99.5, 99.9, 99.95 and 99.99%
Molecular weight:	720.64 g/mol
Mp: Sublimation	>1180 °C >434 °C
Solubility:	organic solvents: soluble
Formula:	C <sub>60</sub>
CAS#:	99685-96-8
Orbital energy:	HOMO 6.1-6.2 eV LUMO 4.5 eV
OLED Device Performance:	ITO/CuPc/NPD/Alq <sub>3</sub> /C <sub>60</sub> /Mg:Ag <sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"><li>• Color: green</li><li>• Max. Luminance: 17200 Cd/m<sup>2</sup></li></ul> ITO/NPD/Alq <sub>3</sub> /C <sub>60</sub> /LiF:Al:Ag <sup>2</sup> <ul style="list-style-type: none"><li>• Color: green</li><li>• Max. Luminance: 7000 Cd/m<sup>2</sup></li><li>• Turn-On Voltage: &lt;5 V</li></ul> ITO/TPD/Alq <sub>3</sub> /C <sub>60</sub> /LiF/Al/Ag <sup>2</sup> <ul style="list-style-type: none"><li>• Color: green</li><li>• Max. Luminance: 4000 Cd/m<sup>2</sup></li><li>• Turn-On Voltage: &lt;5 V</li></ul>



**Carbon 60 Fullerenes** which are often times abbreviated as **C60** represent a growing field of interest in terms of chemical research, nanotechnology, and electronics development. Carbon 60 is unique in the fact nothing quite like it exists in nature.