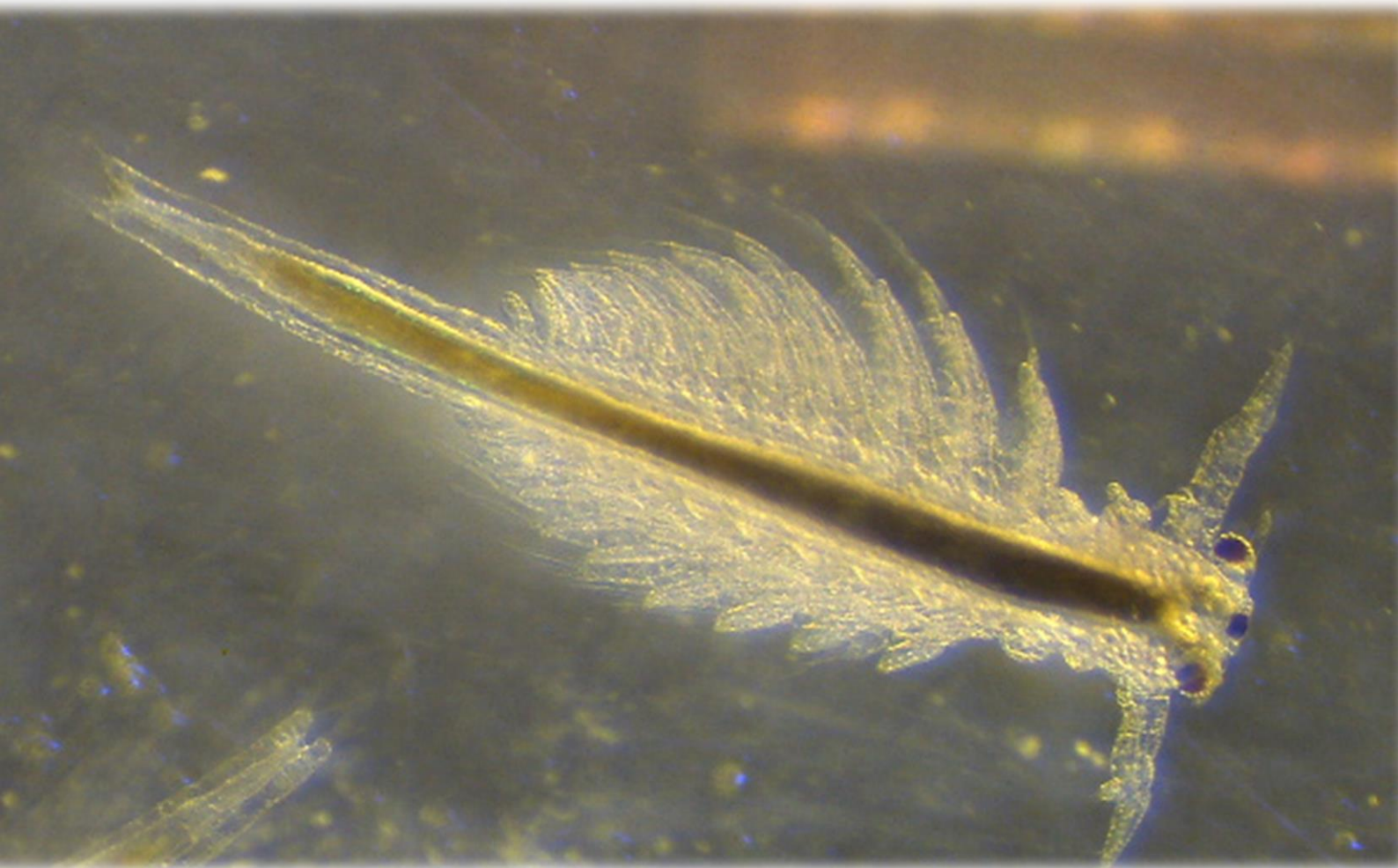




EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DE NANOPARTÍCULAS DE POLIESTIRENO EN *Artemia franciscana*

Efectos sobre su crecimiento, tasa de filtración, supervivencia y respuestas
bioquímicas

Curso académico 2016-2017



Alumna: Yaiza Garcia Mendez

Tutor: Jerónimo Chirivella Martorell

Tutora de prácticas: Inmaculada Varó Vaello

Trabajo Final de Grado

Universidad Católica de Valencia, Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC)

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a la Universidad Católica de Valencia en colaboración con el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC), por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto tan interesante.

Me gustaría agradecer a mi tutora de prácticas Inmaculada Varó por su interminable paciencia, por guiarme y formarme durante toda la estancia en el centro. Enseñándome que con esfuerzo y dedicación se pueden lograr grandes cosas. Y a Aurora Perini por prestarme su ayuda durante el análisis experimental. También todas las personitas del centro que hicieron de esta etapa inolvidable.

Agradecer a mi tutor de TFG Jerónimo Chirivella, por supervisarme y aconsejarme durante todo el proceso.

Quisiera agradecer también a mi profesor de estadística Germán Martín, por la paciencia e incondicional ayuda, por estar dispuesto a ayudarme en lo que necesitara hasta cuando me presentaba de un día para otro en su despacho en busca de auxilio.

Gracias a mi madre por ser incondicional, y a mis más cercanos por aguantar mi estrés constante durante esta etapa.

Y como no, a mi compañera de laboratorio, Claudia Sanz, por tu empatía, solidaridad, vitalidad y ganas de comerse el mundo. Gracias por tanto amiga.

Índice

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 Plásticos y nanoplásticos en medio acuático	5
2.2 Efecto de nanoplásticos (NPs) en organismos acuáticos	8
2.3 <i>Artemia</i> como organismo modelo	10
2.4 Biomarcadores	13
3. OBJETIVO	15
4. MATERIAL Y METODOS	15
4.1 Compuesto químico	15
4.2 Organismos modelo	16
4.3 Bioensayo de toxicidad crónica	16
4.3.1 Diseño experimental	16
4.3.2 Crecimiento y supervivencia	18
4.3.3 Tasa de filtración	19
4.3.4 Preparación de las muestras para determinación de biomarcadores	19
4.3.5 Determinación de biomarcadores.....	20
4.3.6 Contenido de la proteína total.....	21
4.4 Análisis estadístico	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Crecimiento	24
5.2 Supervivencia	25
5.3 Tasa de filtración	26
5.4 Biomarcadores	27
5.5 Contenido en proteína total.....	30
6. DISCUSIÓN.....	31
7. CONCLUSIONES	35
8. LINEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	36
9. BIBLIOGRAFÍA	37

1. RESUMEN

La acumulación de plásticos en ambientes acuáticos tanto dulces como marinos, playas, mares y océanos abiertos es un problema importante para los organismos que en ellos habitan, ya que pueden distribuirse a lo largo de las cadenas tróficas. A diferencia de los macro y microplásticos, que están más estudiados, los nanoplásticos o nanopartículas de plástico (NP) son un contaminante emergente y poco estudiado en la actualidad. Estos pueden verse directa o indirectamente al medio acuático, o por otro lado pueden ser producidos por condiciones bióticas u abióticas del medio, siendo fruto de la degradación de microplásticos.

En el presente estudio llevamos a cabo una serie de bioensayos crónicos donde se expuso la especie *Artemia franciscana* durante 14 días a dos concentraciones subletales 0,1 y 1 µg/mL de nanopartículas de poliestireno de 50 nm funcionalizadas con un grupo amínico (NP-NH₂), por otro lado un grupo control sin nanopartículas, para evaluar su efecto sobre la supervivencia y crecimiento. Además se ha estudiado el efecto sobre el comportamiento alimenticio evaluando su tasa de filtración, así como su respuesta a nivel bioquímico mediante la determinación de biomarcadores (ChE, GST y CbE) y contenido de proteína total. Los resultados del estudio demostraron que las concentraciones de nanopartículas utilizadas no alteraron la supervivencia y crecimiento, mientras que si afectaron a las respuestas de actividad enzimática de los distintos biomarcadores y a su comportamiento alimenticio.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Plásticos y nanoplásticos en medio acuático

La producción global de plásticos se ha disparado en los últimos 50 años, y en especial en las últimas décadas. Entre 2002-2013 aumentó un 50%: de 204 millones de toneladas en 2002, a 299 millones de toneladas en 2013. Se estima que en 2020 se superarán los 500 millones de toneladas anuales de plásticos, lo que supondría un aumento del 900% respecto a los niveles de 1980. (Christoph, Muñoz, y Hernández, 2016).

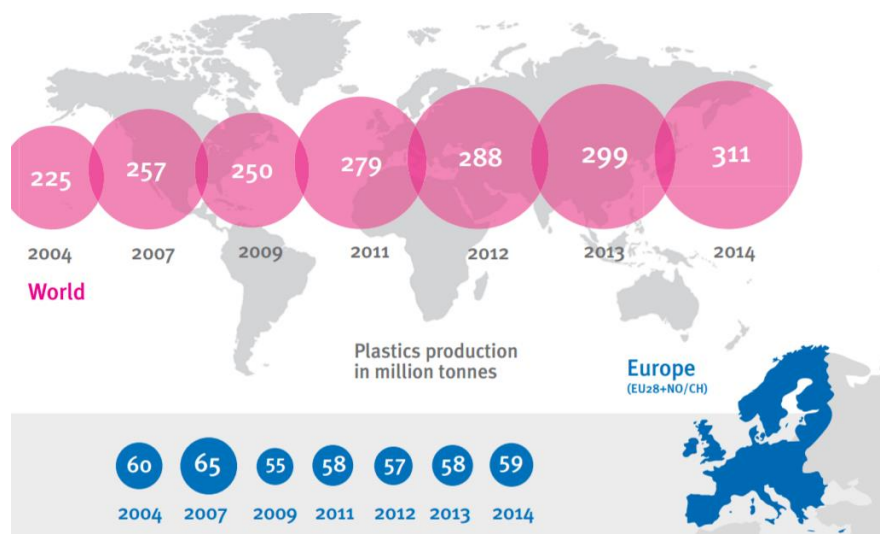


Figura 1. Producción de plásticos en millones de toneladas a nivel global, es estable en Europa pero crece globalmente a lo largo de los años (Europe, 2015).

Los plásticos (macroplásticos) expuestos a la luz solar, a las acciones mecánicas y biológicas, inducidos por corrientes, olas, interacciones con arenas, rocas y organismos, se descomponen en fragmentos cada vez más pequeños (microplásticos). Estos fragmentos han sido encontrados en cada uno de los 5 giros de las corrientes subtropicales de los océanos – y hasta en el hielo antártico – exhibiendo algunas de las concentraciones más altas en análisis de agua realizados a miles de kilómetros de distancia de la costa (Christoph *et al.*, 2016). En la distribución de los desechos plásticos influyen diversos factores, tales como, la geografía de la costa, así y la presencia de corrientes, vientos, rutas comerciales y áreas urbanas (Barnes *et al.*, 2009).

Como procesos de degradación de plásticos han sido identificados la fotodegradación– generada por exposición a la luz solar, la biodegradación – por acción de organismos vivos (generalmente bacterias), la degradación termo-oxidativa – a causa de reacciones de oxidación a temperaturas moderadas, la termodegradación – acción de altas temperaturas y, a menor escala, la degradación por hidrólisis – reacciones con el agua (Christoph *et al.*, 2016).

La abrasión, asistida por diferentes procesos de degradación, puede ser considerada como un factor clave para a la formación de nanoplásticos a partir de fragmentos de mayor tamaño. Por tanto, la presencia de desechos de plásticos en playas y riberas es especialmente crítica, ya que la acción de olas y corrientes en estos lugares da lugar a una abrasión mucho más intensa que en otros sitios (Christoph *et al.*, 2016).

Estos procesos de degradación, suponen cambios químicos que reducen drásticamente el peso molecular promedio del polímero. Dado que la integridad física de los microplásticos depende fundamentalmente de su peso molecular promedio, cualquier grado significativo de degradación, debilita inevitablemente el material. Los microplásticos, se tornan quebradizos deshaciéndose de nuevo en fragmentos, a menudo no visibles a simple vista, reducidos a tamaño *nano* (nanoplásticos) (Figura 2). Además, estas partículas, pueden sufrir una degradación adicional (generalmente a través de la biodegradación mediada por microbios) (Andrady, 1994, 1998; Eubeler *et al.*, 2009).

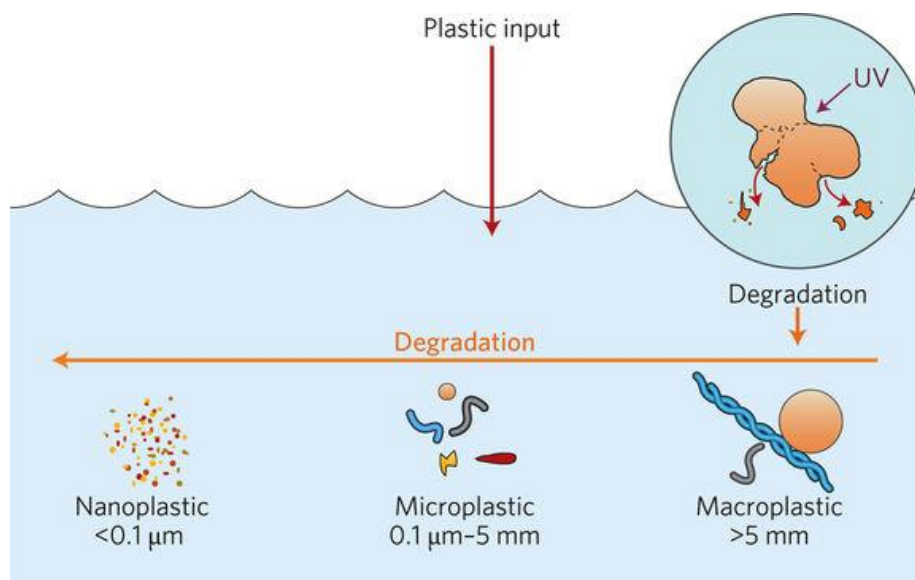


Figura 2. Degradación de macroplásticos a nanoplásticos en el medio acuático (Galloway, 2017).

En la actualidad, la contaminación por micro y nanoplásticos, se reconoce como uno de los problemas de calidad más importantes, para sistemas de agua dulce y marina. En los últimos años, numerosos estudios han centrado su atención en la detección y abundancia de estos contaminantes, en medio marino. En este campo, la ciencia, evoluciona rápidamente. Numerosos estudios se han centrado en la detección y abundancia de macropásticos de más de 5 mm, seguido por un enfoque creciente en microplásticos de menos de 5 mm hasta escala nanométrica. Las implicaciones de las nanopartículas de plástico (nanoplásticos) son un área muy reciente de la ciencia ambiental (Koelmans, *et al.* 2015).

Hartmann *et al.*, (2015) define nanoplásticos (NP) como "partículas de plástico menores de 100 μm en al menos una de sus dimensiones". Sin duda, los NP son la parte menos conocida de los desechos marinos, pero también la más peligrosa. Se han sugerido diversas fuentes de producción de NPs, como la fragmentación a partir de partículas más grandes ('nanofragmentación') (Koelmans *et al.*, 2015).

El poliestireno (PS) es uno de los componentes mayoritarios de los desechos plásticos. Se obtiene, de la polimerización del estireno la cual da lugar a un termoplástico transparente, incoloro, duro y rígido. Su naturaleza resistente y su bajo coste se traduce en una producción global de más de 23 millones de toneladas al año (Lithner, *et al.* 2011). El PS, constituye uno de los plásticos más utilizados en la fabricación de muchos productos (ej. contenedores de alimentos rígidos, envases, cubiertos desechables, aislamiento de edificios, productos médicos, cajas de discos compactos y juguetes). Al tratarse de un material versátil no biodegradable, persiste durante varios cientos de años en el medio marino, donde experimenta una despolimerización lenta (Andrady, 2011). Su monómero, el estireno, actúa como disruptor endocrino y cancerígeno, lo que representa un serio peligro para los organismos marinos expuestos (Lithner, *et al.* 2011).

Los polímeros se definen como macromoléculas compuestas por una o varias unidades químicas (monómeros) que se repiten a lo largo de toda una cadena. Estas cadenas se encuentran entrelazadas, y unidas mediante enlaces relativamente débiles (ej. puentes de hidrógeno y fuerzas van der Waals) o mediante interacciones físicas basadas en la interacción mutua de estas cadenas, con inclusión de espacios vacíos. Estas interacciones débiles, pueden romperse con bajos niveles de energía, conllevando a la degradación de los polímeros (Christoph *et al.*, 2016).

Lambert y Wagner (2016) demostraron la formación de nanoplásticos mediante la degradación de una tapa de taza de café desechable de PS en condiciones estáticas controladas. Utilizando el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), estos autores demuestran la formación de partículas nanométricas que aumentan con el tiempo, mostrando concentraciones de partículas de PS nano tres veces más altas en comparación con el control después de 56 días de exposición, con un tamaño medio de partículas de 224 nm (Lambert y Wagner, 2016).

A escala nanométrica, las propiedades de la materia cambian, presentando una superficie más grande que los materiales a macroescala. Esta característica puede hacerlos químicamente más reactivos, afectando su resistencia y propiedades eléctricas, magnéticas u ópticas. El impacto de los macro y microplásticos sobre los organismos marinos está bien documentado en todo el mundo, sin embargo, la fracción menos conocida y caracterizada de los desechos marinos, debido a su difícil muestreo e la identificación analítica, es probablemente la formada por los nanoplásticos. Las nanopartículas de poliestireno, ampliamente utilizadas para la administración de fármacos en estudios en seres humanos, fueron recientemente recomendadas como modelo de nanoplásticos en estudios ecotoxicológicos (Barnes, 2009).

El impacto que las nanopartículas (NPs) puedan tener sobre el medioambiente a largo plazo, permanece desconocido. La mayoría de las NPs fabricadas por el hombre no se encuentran naturalmente en el medio ambiente, por lo que, los organismos pueden carecer de sistemas inmunes o de eliminación necesarios para su detoxificación. Para que una NP sea considerada un riesgo, debe haber una fuente de exposición a ellas y un daño que resulte de esta exposición. Las NPs se comportan de manera distinta a sus contrapartes macro y micro debido a su tamaño; sin embargo, aún no está claro cómo difieren en sus interacción (Nowack, 2007).

2.2 Efecto de nanoplásticos (NPs) en organismos acuáticos

En la actualidad no hay métodos del todo fiables para comprobar la concentración de NPs que se encuentran en ambientes acuáticos, pero si hay certeza de que pueden llegar a ser un problema ambiental a gran escala.

Además de las consecuencias fisiológicas, los NP también pueden producir efectos químicos. La alta superficie de NPs derivada de su tamaño, puede causar afinidades de absorción fuertes para compuestos químicos, que pueden producir efectos de toxicidad. Pueden acumularse en la membrana celular de los organismos expuestos, debido a su capacidad para traspasarla. Además, el proceso de la nanofragmentación es importante, ya que la liberación de aditivos desde su matriz a nanoescala, aumenta considerablemente el riesgo general (Koelmans *et al.*, 2015).

En cuanto al paso de las NPs a través de la membrana, Rossi y colaboradores (2014) utilizaron simulaciones moleculares para evaluar el efecto del PS de tamaño *nano* (NPs) sobre las propiedades de membranas biológicas modelo y concluyeron que el NP penetraban fácilmente en los lípidos de membranas, afectando a las funciones celulares. Por otro lado, Salvati y colaboradores (2011) demostraron que el nanopoliestireno carboxilado con tamaños que van desde 40 a 50 nm penetró en las células de manera irreversible, a través de diferentes vías de endocitosis. También se han observado respuestas de inflamación en tejido de pulmón de rata en respuesta a partículas de poliestireno de 64 nm, mostrando que un material de baja toxicidad, como el poliestireno (PS), presentaba potencial inflamatorio cuando está presente en forma de nanopartículas (Brown *et al.*, 2001). Este estudio exponía a los individuos mediante inhalación de aire contaminado. No obstante, queda la pregunta de hasta qué punto esto puede extrapolarse a sistemas acuáticos donde la agregación limitaría las concentraciones de NP libres y la inhalación directa de NPs aerotransportadas no ocurre (Koelmans *et al.*, 2015).

Bhattacharya y colaboradores (2010) demostraron que la adsorción de 1,8-6,5 mg/L de partículas de poliestireno de 20 nm (todavía presentes como aglomerados) impedía la fotosíntesis de algas, posiblemente debido a la reducción de la intensidad de la luz y del flujo de aire a través de las nanopartículas y estimuló la presencia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales pueden llegar a provocar estrés oxidativo (Koelmans *et al.*, 2015). En este estudio afirman que en fase acuosa pueden producirse heteroagregaciones de nanoplásticos con algas, sólidos en suspensión y detritus causando la sedimentación de estos materiales o, por consiguiente, su flotación (*upwelling*) en presencia de fuertes corrientes de agua.

Bergami y colaboradores (2016) investigaron el efecto de los nanoplásticos de poliestireno modificados con carboxilo y amino (40-50 nm) y analizaron el efecto sobre la mortalidad y los efectos subletales sobre nauplios de *A. franciscana*. Los nanoplásticos afectaron a la alimentación, la motilidad y la muda de los nauplios de *A.*

franciscana. Otros resultados indican que los NPs afectan no sólo al organismo y a la población sino también a los ecosistemas (Chae & An, 2017).

2.3 *Artemia* como organismo modelo

Los estudios de ecotoxicología consisten en bioensayos donde se expone a un organismo modelo escogido a diferentes concentraciones de un contaminante determinado, y se estudia los efectos derivados de la exposición, a diferentes niveles de organización, abarcando desde el molecular hasta el ecosistémico.

Dentro de los diferentes contaminantes existentes se encuentran los xenobióticos. Se trata de compuestos de naturaleza sintética, elaborados en laboratorio para cubrir necesidades específicas tales como productos de aseo personal, fármacos o envases plásticos. Su estructura química en la naturaleza, es poco frecuente por lo que su biodegradación es lenta o inexistente, y para los que no existe regulación normativa (Van der Oost, Beyer, & Vermeulen, 2003).

El género *Artemia* representa uno de los organismos más ampliamente utilizado en estudios ecotoxicológicos. Se compone por crustáceos branquiópodos anostráceos, y constituye uno de los taxones más antiguos conocidos datados en Cretácico inferior, hace más de 100 millones de años. Poseen un cuerpo segmentado, recubierto por una cutícula fina de quitina flexible que, mediante un proceso de muda, se renueva periódicamente, permitiendo el crecimiento del animal. Presentan unos apéndices torácicos en forma de hoja (denominados *filópodos* o *toracópodos*) con funciones locomotora, respiratoria y filtradora (Redón, 2015).

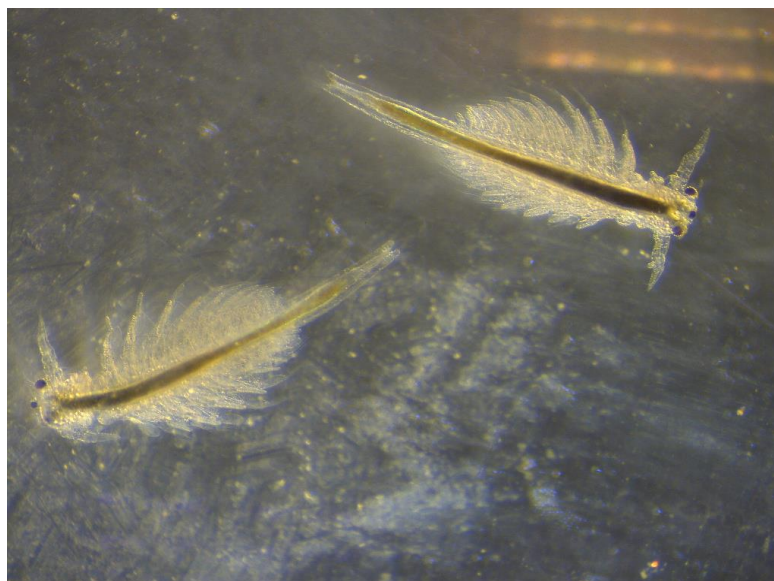


Figura 3. Ejemplares en fase de metanauplio de *A. franciscana*. Fuente: elaboración propia.

Es el crustáceo más abundante y un organismo clave en el funcionamiento de los ecosistemas hipersalinos. Las especies del género *Artemia* están distribuidas por todo el planeta, con excepción del continente antártico. Estas se caracterizan por habitar biotopos hipersalinos, con escasa diversidad animal y vegetal, y con una limitada presencia de predadores. La salinidad es el factor externo más importante que condiciona tanto su desarrollo y reproducción como la dinámica de sus poblaciones. En general, los umbrales térmicos máximo y mínimo de supervivencia para este género se sitúan entre 5 y 35 °C, aunque estos límites no son fijos y varían según cada especie y población. Además, *Artemia* debe hacer frente de forma habitual a un medio con una escasa cantidad de oxígeno disponible, con constantes situaciones de hipoxia (concentraciones menores de 2 ml O²·L⁻¹) y anoxia (Martín, Gavil, & Varó, 2016).

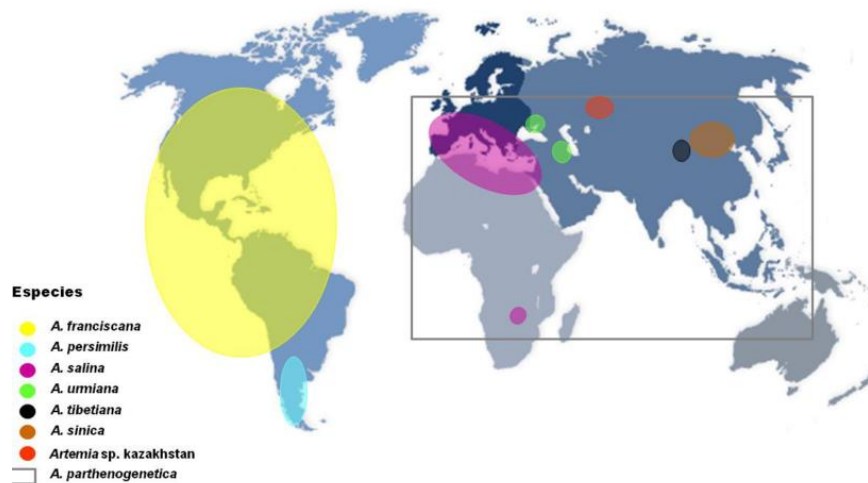


Figura 4. Distribución de las distintas especies de *Artemia* a nivel global, entre ellas *A. franciscana* que es nuestro organismo modelo (Redón, 2015).

Artemia es la especie de presa viva que más se utiliza en el cultivo de larvas de peces y crustáceos. La explotación de quistes de *Artemia* tiene un elevado interés económico, ya que de ella depende la producción mundial de larvas de peces (sobre todo marinas) y de crustáceos. (Viciano, 2015.) *A. franciscana* es una de las especies bisexuales nativas del continente americano y especie clave en acuicultura, mencionado anteriormente. En la actualidad los nauplios de *A. franciscana* sigue siendo un recurso insustituible en la mayoría de plantas de cultivo de peces, crustáceos y moluscos (cefalópodos), utilizados (directamente o tras un proceso de enriquecimiento nutricional) como alimento vivo para las larvas de muchas de las especies que se comercializan. Esto se debe, por un lado, a su buena digestibilidad, ausencia de respuesta de escape, coloración llamativa y buena palatabilidad; además de poderle inducir una óptima calidad nutricional como resultado del desarrollo de

técnicas de enriquecimiento; y por otro lado, a su amplia disponibilidad y a su manejo sencillo y versátil (Redón, 2015).

Pese a sus excelentes características, el uso de *Artemia* como organismo modelo en bioensayos de toxicidad por NPs son, sorprendentemente, recientes y escasos.

En los últimos años se está utilizando *Artemia* como organismo modelo en estudios de ecotoxicología en medios marinos e hipersalinos de contaminantes emergentes como son los compuestos farmacéuticos y las nanopartículas. Su uso como organismo modelo se debe a que presenta una serie de características como son el amplio conocimiento que se tiene de su biología, que es un organismo que se adapta muy bien a las condiciones de laboratorio, y con un ciclo de vida muy corto; además, su tamaño pequeño permite reducir los volúmenes en los ensayos de toxicidad. Estas características, junto con la facilidad de obtener sus nauplios (primera fase de desarrollo) listos para realizar ensayos de toxicidad, a partir de la eclosión de los quistes en muy pocas horas, la han convertido en un organismo idóneo para estudiar la toxicidad de xenobióticos en medios marinos e hipersalinos. (Libralato, 2014; Nunes, *et al.* 2006).

Los ejemplares de *Artemia* pueden fijar los contaminantes presentes en el medio por filtración con el tamaño adecuado, ya que son filtradores pasivos, o adherirse a su cuerpo debido a la hidrofobicidad que presentan, lo que los convierte en un vector de transmisión de dichos contaminantes a niveles superiores de la cadena trófica, tanto natural como artificial. *Artemia* tiene la ventaja de poder ser utilizada en los ensayos de toxicidad como una sola especie, en comparación con otras especies del género, o con poblaciones de la misma especie en estudios más amplios, lo que permite obtener interpretaciones globales de los riesgos sobre los ecosistemas (Martín *et al.*, 2016).

Se ha incrementado el empleo de *Artemia* para determinar la sensibilidad/toxicidad mediante el desarrollo y validación de biomarcadores, dado el incremento de xenobióticos en los medios acuáticos como fármacos y nanopartículas. No obstante, las distintas especies, cepas y fases del desarrollo presentan distinto grado de sensibilidad/resistencia, por lo que hay que tener en consideración este hecho a la hora de interpretar y extrapolar los resultados (Comeche, 2015).

2.4 Biomarcadores

Un biomarcador se define como un cambio en una respuesta biológica (que va desde respuestas moleculares, celulares y fisiológicas hasta cambios de comportamiento) que pueden estar relacionados con la exposición y/o efectos tóxicos de los compuestos químicos ambientales (Peakall, 1994). Van Gestel y Van Brummelen (1996) redefinieron los términos biomarcador, bioindicador e indicador ecológico, vinculándolos a diferentes niveles de organización biológica. Consideraron un biomarcador como cualquier respuesta biológica a una sustancia química ambiental a nivel subindividual, medida dentro de un organismo o en sus productos (orina, heces, pelo, plumas, etc.), indicando una desviación del estado normal del organismo. Un bioindicador se define como un organismo que da información sobre las condiciones ambientales de su hábitat por su presencia o ausencia o por su comportamiento, y un indicador ecológico es un parámetro ecosistémico que describe la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas.

Las respuestas de los biomarcadores pueden considerarse como efectos biológicos o bioquímicos medibles después de una exposición a xenobióticos, lo que los hace muy útiles como indicadores tanto de la exposición como de los efectos (Van der Oost, *et al*, 2003).

Las enzimas relacionadas con la biotransformación de xenobióticos, así como sus metabolitos, son los biomarcadores más estudiados en la actualidad; siendo la biotransformación la conversión catalizada por una enzima del compuesto xenobiótico en una forma más soluble al agua, pudiendo ser excretada con facilidad respecto al compuesto original (Lech y Vodick, 1985). Otros marcadores bioquímicos muy utilizados son las alternaciones enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo (ej. la enzima glutatión-S-transferasa (GST) y la inhibición de la actividad colinesterasas (ChEs) y la inhibición de las colinesterasas (ChEs), por ser los más sensibles a la presencia de xenobióticos en el medio (Nunes *et al.*, 2006).

El análisis de la actividad ChE se usa como indicador de neurotoxicidad. Se trata de una enzima relacionada con el sistema nervioso colinérgico cuya función consiste en finalizar la transmisión sináptica hidrolizando la acetilcolina (ACh), neurotransmisor en muchas sinapsis, especialmente en las neuronas motoras. Durante la neurotransmisión, la acetilcolina (ACh) se libera desde el nervio de la

hendidura sináptica y se une a los receptores de ACh en la membrana post-sináptica, retransmitiendo la señal del nervio. La ChE también se encuentra en esta membrana, lugar donde se termina la transmisión de la señal mediante la hidrólisis de la ACh, dando lugar a tiocolina. La inhibición de esta enzima da lugar a la acumulación de ACh en la membrana post-sináptica y a la interrupción de la transmisión de los impulsos nerviosos, lo que puede dar lugar en último término a la muerte del organismo (Comeche, 2015). En organismos filtradores como *Artemia*, la inhibición de la ChE, se traduce en una disminución de la actividad motora del individuo, que altera funciones fisiológicas, como la respiración, la natación o el comportamiento alimenticio, entre otras, pudiendo producir su muerte (Varó, *et al.* 2002).

La conjugación de compuestos electrofílicos (o metabolitos de fase I) con GSH es catalizada por las glutatión S-transferasas (GSTs), una superfamilia multigénica de enzimas dimericas, multifuncionales, principalmente solubles. Aparte de sus funciones esenciales en el transporte intracelular (heme, bilirrubina y ácidos biliares) y la biosíntesis de los leucotrienos y prostaglandinas, un papel importante de la GST es la defensa contra el daño oxidativo y los productos peroxidantes del ADN y los lípidos (Van der Oost *et al.*, 2003). La enzima GST está involucrada en la fase II de los procesos de biotransformación de xenobióticos o sustancias nocivas para las células, catalizando la conjugación de estos compuestos con el glutatión reducido (GSH). La conjugación se da mediante el ataque nucleofílico del GSH sobre el centro electrófilo de la estructura tóxica y permite la protección de los grupos nucleófilos vitales en macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Como resultado, los ácidos mercaptúricos formados pueden ser excretados más fácilmente (Nunes *et al.*, 2006).

La carboxilesterasa (CbE) está relacionada con las enzimas de la fase I del metabolismo de los xenobióticos. Los productos formados en esta primera fase pueden ser eliminados directamente o bien pasar a las reacciones de la fase II, las de conjugación. Las CbEs hidrolizan los ésteres carboxílicos de los xenobióticos, dando lugar al correspondiente ácido y alcohol, provocando su inactivación. Algunos contaminantes pueden unirse a la CbE, inhibiendo su actividad catalítica (Nunes, 2011)

Existen otros indicadores de toxicidad por nanoplasticos como son las alteraciones morfológicas, incremento de la mortalidad o alteración del comportamiento alimenticio.

3. OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de los nanoplásticos sobre la supervivencia, crecimiento, comportamiento alimenticio y respuestas bioquímicas (biomarcadores) de la especie bisexual de *Artemia franciscana*.

Para ello se llevaron a cabo una serie de bioensayos crónicos (14 días) donde se examinaron dos concentraciones subletales de nanopartículas de poliestireno funcionalizadas con un grupo amino con carga positiva (NPS-NH₂) (0,1 y 1 µg/mL), además de un grupo control sin NPs.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Compuesto químico

En este bioensayo utilizaron nanopartículas de poliestireno funcionalizadas con grupo amino con carga positiva (NPS-NH₂) como material nanoplástico obtenidas de la casa comercial *Bangs Laboratories*. Las NPS-NH₂ son comercializadas en una solución stock con agua destilada y las características proporcionadas por el fabricante son: partículas de un diámetro de 53 nm, contenido sólido del 10.3% en peso, una densidad de 1.05 g/mL, $1.265 \cdot 10^{15}$ partículas/mL, $1.222 \cdot 10^{16}$ partículas/g de partículas secas y un área de superficie de $1.078 \cdot 10^{14}$ µm²/g.

A partir de la solución stock se preparó, utilizando agua miliQ, una solución de trabajo (1:100) con una concentración de 1030 mg NPS-NH₂/L para realizar los bioensayos. Esta solución se elaboró para evitar alterar lo mínimo posible el stock original. Antes de extraer las nanopartículas se sonicó durante 10 minutos la solución stock para separar cualquier aglomeración de los nanoplásticos.

Se calculó el volumen necesario para cada concentración ya que hemos expuesto organismos a concentraciones subletales de 0,1 y 1 µg/mL de NPS-NH₂, en un volumen final de cultivo de 100-150 mL, dependiendo de la fase de desarrollo (edad) de los organismos. Para la renovación total de medio, las nanopartículas se añadieron a partir de la solución de trabajo (1:100), previamente sonicada, y se tuvo especial cuidado para evitar la contaminación del material con las NP.

4.2 Organismos modelo

Para llevar a cabo los bioensayos se utilizaron individuos de la especie bisexual americana *A. franciscana*. Se emplearon quistes deshidratados comerciales de la casa INVE (Bélgica), que se eclosionaron siguiendo el procedimiento descrito en Amat (1985) y Medina (2002). Así, una vez pesados los quistes (0,100 g), se hidrataron en agua de mar ($37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) en tubos cilíndricos de 1 L de capacidad, dotados de un sistema de aireación individual por burbujeo de aire desde el fondo, mantenidos en baño termostático a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y expuestos a una iluminación constante de 1.000 lux. Los nauplios recién eclosionados (instar I) fueron separados de los no eclosionados, cáscaras y muertos, gracias a su fototropismo positivo antes de iniciar el ensayo de toxicidad crónica.

4.3 Bioensayo de toxicidad crónica

4.3.1 Diseño experimental

Un ensayo de toxicidad crónica consiste en someter al organismo a una serie de condiciones en un largo periodo de tiempo, entre 7 y 15 días.

En el presente estudio se establecieron 2 concentraciones subletales de exposición y un medio control sin NP. Los nauplios (instar I) se expusieron durante 14 días a unas concentraciones subletales de 0, 0,1 y $1 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$ de NP (NPS-NH₂) en matraces Erlenmeyer de 150 ml de capacidad. Se expusieron 4 réplicas de cada concentración (0, 0,1 y $1 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$ de (NPS-NH₂)) en total 12 Erlenmeyers. El número inicial de individuos fue 100 en 100 mL y se aumentó a 150 mL tras 7 días de exposición, coincidiendo con la renovación de medio debido al tamaño de los individuos con el correspondiente aumento del número de nanopartículas para mantener la concentración de las mismas en el medio. El fotoperiodo fue de 16h luz: 8h oscuridad, y los Erlenmeyer tuvieron aireación constante y permanecieron tapados con papel de aluminio para evitar la evaporación de medio. En todos los bioensayos se utilizó agua de mar filtrada a $0,2 \text{ } \mu\text{m}$ para evitar cambios en el comportamiento de las NP en el agua.



Figura 5. Diseño experimental utilizado, detalle del montaje dentro de la cámara termostatzada mantenida a 25°C. Fuente: elaboración propia.

Se llevaron a cabo renovaciones completas de medio cada 2-3 días, con un total de 3 renovaciones a lo largo de los 14 días de exposición. Como alimento se utilizó la microalga viva de la especie *Tetraselmis suecia* a una concentración de cel/mL que se ajustaba a medida que aumentaba el tamaño de los individuos, y se añadían de nuevo las nanopartículas correspondientes a cada concentración. Las exposiciones se llevaron a cabo 2 veces para tener un número suficiente de individuos expuestos para realizar los diferentes análisis.

Las condiciones experimentales se determinaron previamente con un bioensayo en donde se comprobaron el volumen de agua final, el número de individuos en cada replica, la cantidad de alimento (nº de cel/ml), el tipo de alimento (alga viva o alga interte) y si se utilizaba aireación o no. Este bioensayo consistió en exponer 4 Erlenmeyers con individuos alimentados con alga inerte de la especie *T.suecia* y otros 4 Erlenmeyers alimentados con alga viva de la misma especie en las mismas condiciones de; 100 individuos en 100 mL, fotoperiodo de 16h luz: 8h oscuridad, aireación continua, tapados con papel de aluminio para evitar la evaporación y renovación de medio cada 2-3 días.

En este bioensayo de prueba se comprobó que el alga viva favorecía el crecimiento y desarrollo de la *Artemia*, en comparación con el alga inerte. También comprobamos que los 100 mL de volumen hacía que los organismos al crecer se estresaran más debido al aumento de su tamaño a lo largo del desarrollo, de tal forma que en la tercera renovación, y coincidiendo con una semana de edad, se decidió aumentar el volumen de agua a 150 ml. Por último, se mejoró el sistema de aireación

usando un solo aireador más potente para poder generar la misma presión de aire a todos los Erlenmeyers.

Para llevar a cabo las renovaciones totales de medio cada 2-3 días, se preparaba previamente agua de mar filtrada a 0,2µm añadiéndole la concentración de alga viva *T.suecica* que correspondía, dependiendo de la edad de los individuos. La concentración de microalga se determinó en una cámara Neubauer, contando el número de células que contenía la muestra, diluida previamente (1:10), y utilizando la siguiente ecuación: $Concentración = n^{\circ} \text{ de células} \times 10000 / n^{\circ} \text{ de cuadros} \times dilución$; posteriormente se utilizaba la ecuación: $Cinicial \times Vinicial = Cfinal \times Vfinal$ (donde C=concentración y V=volumen), con ello se obtuvo la concentración de alimento deseada en el volumen que se necesitaba para llevar a cabo la renovación de medio.

En cuanto al manejo de los individuos, se utilizó un filtro para los cambios al medio renovado, y a partir de ahí se volvían a introducir en los Erlenmeyers para evitar la dilución del medio al añadir el alimento. Una vez contados los individuos y puestos en los Erlenmeyers, se introducían las nanopartículas y se enrasaban hasta el volumen previsto.

4.3.2 Crecimiento y supervivencia

Para medir el crecimiento de los organismos el primer día se medían 20 nauplios de 0 horas (instar I), y coincidiendo con la renovación de medio se separaban 5 individuos de cada replica, es decir, se medían 20 ejemplares de cada concentración y de control; y el último día también se separaban 5 individuos de cada replica. En total se llevaron a cabo en cada bioensayo un total de 5 mediciones de talla a lo largo del ensayo crónico.

La medición de talla se llevó a cabo con ayuda de un microscopio estereoscópico LEICA MZ6 con cámara incorporada LEICA hz6 y el programa LAS (Leica Application Suite) analizador de imágenes, con este se llevó a cabo las fotos del organismo, y mediante un programa complementario de medición, ImageJ (National Institutes of Health, USA), se midió la talla real de cada individuo y haciendo una media de las medidas de los organismos de cada día, se obtuvo una talla media de cada grupo. Los ejemplares fueron anestesiados previamente con una solución de agua saturada de cloroformo, y estos después de la medición de la talla fueron eliminados del experimento.

La supervivencia de los organismos a lo largo del experimento se llevó a cabo contando detalladamente el número de individuos que había en cada renovación total de medio y comparándolos con el número de individuos inicial (100).

4.3.3 Tasa de filtración

A lo largo de cada bioensayo se llevaron a cabo 2 experimentos para determinar la tasa de filtración tras una exposición crónica de 7 y 14 días a concentraciones subletales de nanopartículas NPS-NH₂, y analizar si afectaba al comportamiento alimenticio de la *A.franciscana*.

Para comprobar si la exposición a las distintas concentraciones de nanopartículas alteraba la tasa de filtración (TF). Se separaron 24 individuos de cada tratamiento (0, 0,1, 1 µg/mL) en placas multiwell de 6 pocillos, en cada uno de los pocillos se pusieron 6 individuos en 6 ml de agua de mar filtrada a 0,2 µm, se mantenían en oscuridad durante 1 hora para que los organismos vaciaran el aparato digestivo.

A continuación, se preparaba un medio con alga viva donde se calculaba la concentración inicial de alga viva *T.suecia*. Los ensayos se realizaron en placas multiwell de 12 pocillos, donde se separaban 3 individuos en 3 ml de medio con alimento, y dos pocillos solo contenían el alimento para comprobar que no hubiera crecimiento del alga.

Estas placas se mantenían en completa oscuridad durante 3 horas, y posteriormente se separaban los individuos del medio y se calculaba la concentración de alga final. Los individuos de este experimento se utilizaban para la medición de talla y posteriormente se eliminaban del experimento.

Para calcular la concentración de alga se contaron las células de alga que había en cada pocillo utilizando una cámara Neubauer.

4.3.4 Preparación de las muestras para determinación de biomarcadores

Al final del bioensayo se llevó a cabo la recogida de las muestras, de tal forma que los individuos se lavaron con agua destilada sobre una malla para eliminar posibles restos de sal, y se introdujeron en grupos de 40 individuos en tubos eppendorf de 1,5 mL de capacidad, posteriormente se congelaron a una temperatura de -80°C hasta el análisis.

A la hora de preparar las muestras para la medición de biomarcadores, previamente congeladas, en primer lugar se descongelaron en frío y se le añadieron 250 μL de tampón de homogenización, posteriormente con ayuda de un homogenizador manual para eppendorf y se homogenizaron en frío durante un minuto.

A continuación las muestras se sonicaban durante 2 minutos, y posteriormente se metían en el congelador de -80°C durante 30 minutos. Después de ser congeladas se volvían a sonicar durante 2 minutos y se le añadía 950 μL de tampón de homogenización para tener un volumen final de 1200 μL , y se centrifugaban durante 15 minutos a 10000g a 4°C . Finalmente, se alicuotaban las muestras con el volumen necesario para determinar cada biomarcador (ChE 320 μL ; GST 170 μL ; CbE 90 μL ; proteína total: cantidad restante). Posteriormente se guardaban a -80°C hasta que fueran utilizadas para las determinaciones de los biomarcadores.

4.3.5 Determinación de biomarcadores

Colinesterasa (Che)

Para medir la actividad de la enzima colinesterasa (ChE), se realizó un ensayo adaptado a microplaca siguiendo el procedimiento descrito en (Varó *et al.*, 2015) y usando ATC (acetiltiocolina) como sustrato.

Utilizando una microplaca de 96 pocillos, se dejó una fila para el blanco y el resto para muestras. Para el blanco se pipetearon 100 μL de tampón fosfato (TF) (100mM pH 7,4), a continuación se pipetearon 100 μL de muestra sin diluir por triplicado, y se añadió a todos los pocillos 200 μL de la solución de reacción (SR) preparada con 100mM TF (pH 7,4, con 150 mM KCL), 0,75 mM de acetilcolina ATC y 10mM DTNB (5,5'-ditio-bis (2-dinitrobenzoico)).

La absorbancia fue medida cinéticamente a una longitud de onda de 415 nm en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution), a 25°C durante 30 minutos (un ciclo por minuto). La actividad ChE fue expresada como nanomoles del sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína (nmol/min \cdot mg proteína) y se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Pendiente } (\Delta\text{Abs} / \text{min}) \cdot \text{volumen total } (\mu\text{l}) \cdot 1000 \cdot \text{factor de dilución}}{\epsilon \text{ (} M\text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)} \cdot \text{volumen muestra } (\mu\text{l}) \cdot \text{proteína } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \cdot \text{corrección paso luz}}$$

$$= \text{nmol/min/mg proteína}$$

Dónde: $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y la corrección de la trayectoria de la luz para el volumen final del ensayo de 300 μL igual a 0.9 cm

Glutación-S-Transferasa (GST)

El ensayo para determinar la actividad GST, basado en Habig (1974) se realizó en microplaca siguiendo el procedimiento descrito en Solé *et al.* (2015). Se pipeteó 50 μL de muestra y de TF para el blanco, ambos por triplicado, mezclándose rápidamente con 200 μL de solución de reacción (SR), preparada en fresco (100 mM TF pH 7.4, con 150mM KCL; 1,04 mM de CDNB (1-cloro-2,4- dinitrobenceno) y glutatión reducido 1,04 mM (GSH)). La reacción fue medida cinéticamente de inmediato a una longitud de onda de 340 nm en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution) a 25 °C, durante 15 minutos (1 ciclo por minuto). La actividad GST se expresó como: nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína y se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer según se describe en el apartado anterior de colinesterasa. Siendo en este caso: $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y la corrección de trayectoria de la luz para un volumen final de 250 μL igual a 0.85 cm.

Carboxilesterasa (CbE)

La actividad carboxilesterasa (CbE) se determinó siguiendo el método de Mastropaolo y Yourno (1981) adaptado a microplaca como se describe en Solé *et al.* (2015) usando acetato de p-nitrofenilo (pNPA) como sustrato.

Se pipetearon 25 μL de muestra y de TF para el blanco (50 mM pH 7,4) por triplicado. A continuación, se añadió 200 μL de solución de reacción SR (100 mM de APN y 50 mM de PB de pH 7,4) en cada pocillo justo antes de leer. La absorbancia se leyó inmediatamente a 405 nm durante 3 minutos a 25°C, usando un lector de microplacas TECAN Ultra Evolution. La actividad de CbE se expresó como nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto por miligramo de proteína (nmol / min / mg de proteína) y se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer según se describe en el apartado 4.6.1, donde: ϵ tiene un valor de $23,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y la corrección de trayectoria de la luz para el volumen de ensayo (225 μL) es 0.8 cm.

4.3.6 Contenido de la proteína total

La cuantificación de proteína, basada en el método de Bradford, se trata de un procedimiento sencillo y preciso que permite determinar la cantidad de proteína

solubilizada mediante adición de un tinte de naturaleza ácida sobre la solución de proteína y la subsecuente medida a 595 nm con ayuda de un espectrofotómetro.

Se observa un cambio gradual de color en la solución teñida en función del contenido de proteína que presente. El máximo de absorbancia ocurre dentro del rango 465- 595 nm. El tinte se une a los residuos aminoácidos básicos aromáticos, especialmente a la arginina. (Bradford, 1976)

La concentración de proteína total en cada muestra se determinó utilizando un reactivo comercial de la casa Bio-Rad y albúmina bovina (BSA) como patrón. Para realizar la curva patrón se utilizaron concentraciones crecientes de BSA entre 0 y 0,5 mg/mL.

Utilizando una microplaca de 96 pocillos, se pipetearon 10 μ L de la concentración conocida de la curva patrón de BSA, y 10 μ L de la muestra diluida (1:2) por triplicado. A continuación, se añadieron 200 μ L de reactivo Bio-Rad diluido (1:5) a cada pocillo, e se incubó, la microplaca en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos hasta que el color se estabilizara, y se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas TECAN (Ultra Evolution). La concentración de proteína total en cada muestra se determinó interpolando el valor de la absorbancia de las muestras en la recta patrón y fue expresada en mg/mL.



Figura 6. Ensayo de proteína total, detalle de microplaca de 96 pocillos con la recta patrón (filas A-C y columnas 1-3) y las muestras. Fuente: elaboración propia.

4.4 Análisis estadístico

El efecto de las concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) sobre la supervivencia de los individuos de *A.franciscana*, se analizó mediante un análisis de supervivencia de Kaplan Meier, el cual indicaba la supervivencia de los grupos tratados a lo largo del bioensayo.

Para el análisis del efecto de las concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) sobre el crecimiento llevamos a cabo un experimento cuyos resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA de dos vías), para contrastar el efecto de concentraciones de NP respecto al tiempo (edad) y para el análisis *post hoc* utilizamos el test Tukey para observar diferencias entre grupos experimentales. Previamente se comprobó que se cumplían las condiciones de normalidad y homocedasticidad de las varianzas mediante el test Shapiro-Wilk y test de Levene respectivamente.

Para comprobar el efecto de las nanopartículas sobre los biomarcadores se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA de una vía) y un *post hoc* con el test Dunnett para determinar las diferencias entre los grupos experimentales expuestos a NP (0,1 y 1 µg/mL) respecto al grupo control.

Los resultados se presentan como media ± desviación típica. Todo el análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del software IBM SPSS Statistics, con un nivel de significación del 95% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Crecimiento

La variación de la talla de los individuos desde su eclosión (0h) hasta los 14 días mantenidos en condiciones estándar de cultivo y sometidos a las diferentes concentraciones subletales de NP se presenta en la figura 7, donde la talla aumentó significativamente respecto al tiempo ($p \leq 0.05$).

Los resultados de ANOVA de dos vías indicaron que el factor tratamiento (0, 0,1 y 1 $\mu\text{g/mL}$) no fue significativo sobre la variable talla. Por otro lado, la variable tiempo sí influyó significativamente sobre la talla de los individuos, incrementándose a lo largo del bioensayo ($p \leq 0.05$). Finalmente, hubo interacción entre la variable tratamiento y tiempo ($p \leq 0.05$).

Cómo se observa en la figura 7, a los 14 días de exposición los grupos experimentales tratados con NP (0,1 y 1 $\mu\text{g/mL}$) presentan una talla media mayor que el grupo control, pero no de forma significativa.

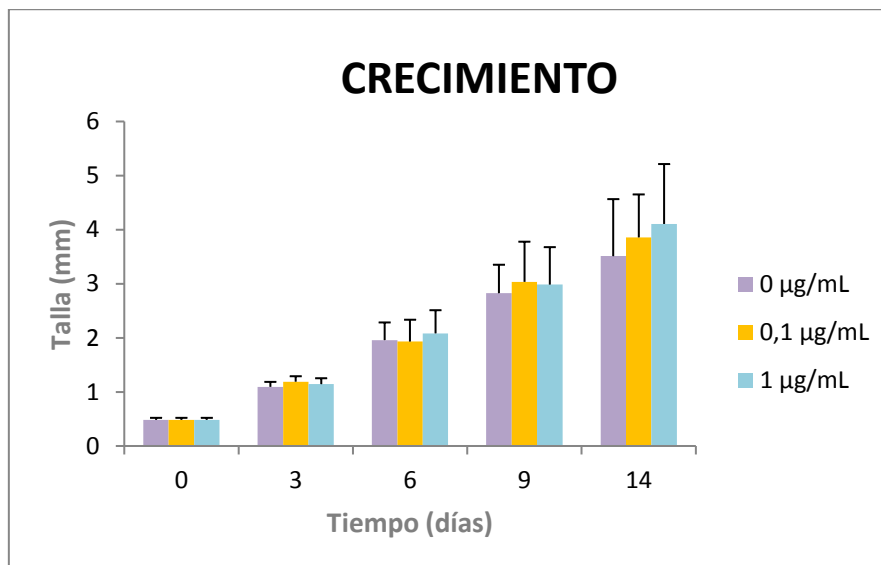


Figura 7. Variación de la talla en *A.franciscana*, expuestas a concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) durante 14 días.

5.2 Supervivencia

La variación de la supervivencia de los individuos de 0 horas a 14 días en condiciones estándar de cultivo y sometidos a las diferentes concentraciones subletales de NP se presenta en la figura 8. Los resultados del análisis de supervivencia de Kaplan Meier indican que la supervivencia disminuyó a lo largo del tiempo.

Durante el periodo de exposición se observa que el grupo de expuesto a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ presenta una menor supervivencia hasta el final del bioensayo, después de 14 días de exposición. En cuanto al grupo control presenta una supervivencia intermedia entre respecto a los dos grupos expuestos a NP, siendo el de concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ el de mayor supervivencia.

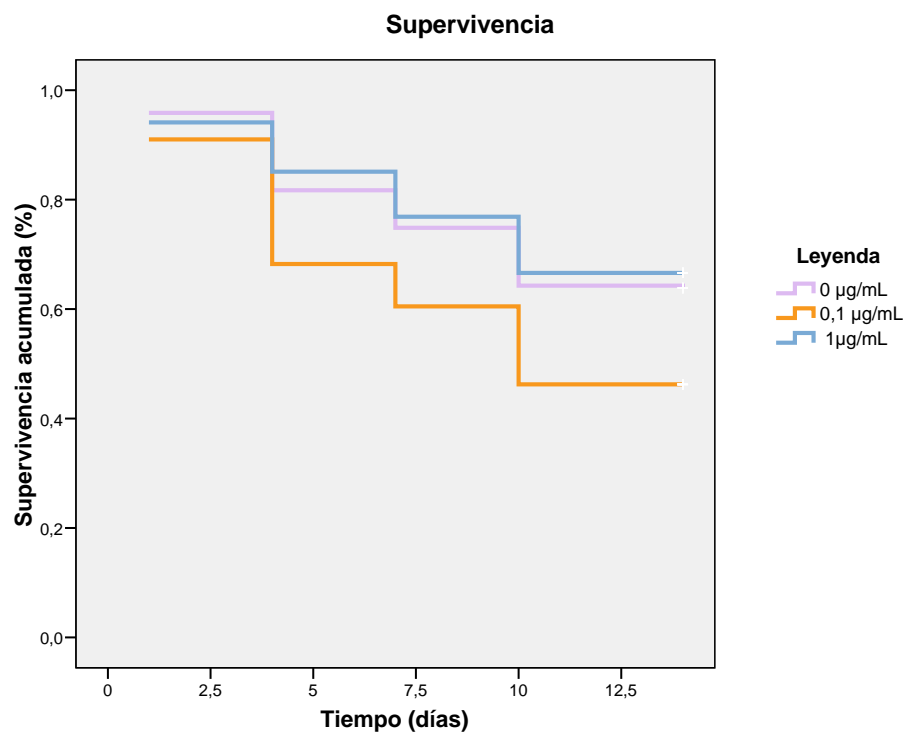


Figura 8. Variación de la supervivencia de *A. franciscana*, expuestas a concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) durante 14 días, donde el eje vertical representa la supervivencia acumulada y el horizontal los días de exposición (1-14).

5.3 Tasa de filtración

En las figuras 9 y 10, queda representada la influencia del tratamiento sobre el comportamiento alimenticio de los individuos, se observa como en la figura 9, a 7 días de exposición, el grupo control (0 µg/mL) posee una tasa de filtración mayor respecto al grupo expuesto a 0,1 µg/mL y menor respecto al grupo 1 µg/mL, experimentado éste último el mayor aumento.

En cambio, en la figura 10, a 14 días de exposición, los organismos del grupo control (0 µg/mL) vieron aumentada su tasa de filtración, mientras que el grupo de 1 µg/mL experimentó una disminución

Los resultados del análisis estadístico mostraron diferencias significativas entre la variable tiempo respecto a la tasa de filtración ($p \leq 0.05$). Por otro lado, no se observaron interacciones entre la variable tratamiento y la variable tiempo.

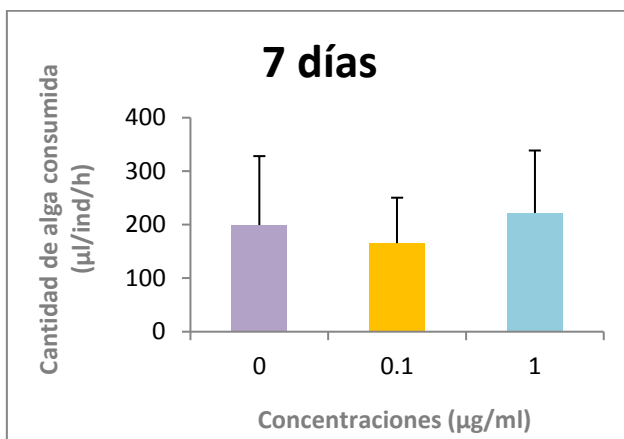


Figura 9. Tasa de filtración en *A. franciscana* tras 7 días de exposición a dos concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) (0,1y 1µg/mL), junto con el grupo control (0µg/mL).

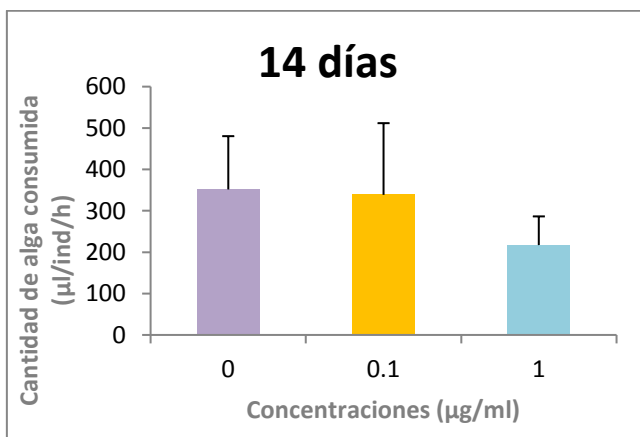


Figura 10. Tasa de filtración en *A. franciscana* tras 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) (0,1y 1µg/mL), junto con el grupo control

5.4 Biomarcadores

Colinesterasa

En la figura 11 se representa la actividad enzimática ChE en *A. franciscana* tras 14 días de exposición a NP (NPS-NH₂). El resultado del tratamiento estadístico (ANOVA de una vía con test *post hoc* Dunnet) mostró una influencia significativa del tratamiento sobre la actividad enzimática, señalando diferencias significativas del grupo de concentración 1 µg/mL frente al grupo control ($p \leq 0.05$).

El grupo expuesto a una concentración subletal de NP (NPS-NH₂) 0,1 µg/mL, presenta mayor actividad de la ChE en comparación con el grupo de 0 y 1 µg/mL, siendo este último (1 µg/mL) el de menor actividad.

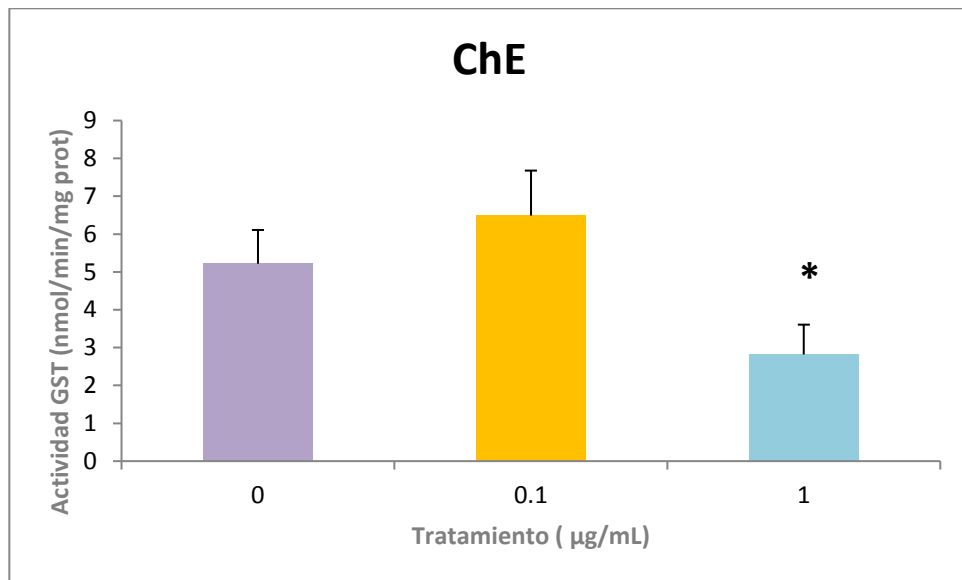


Figura 11. Actividad ChE en *A. franciscana* tras 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) (0,1 y 1 µg/mL), junto con el grupo control (0 µg/mL). (*) señala diferencias significativas entre grupos expuestos a NP respecto al control tras el resultado del análisis del ANOVA de una vía y el test *post hoc* con Dunnet ($p \leq 0.05$). Los datos se representan como medias \pm std (desviación estándar).

Glutathion-S-Transferasa

El análisis estadístico de la actividad GST (ANOVA de una vía con test *post hoc* Dunnet) mostró una influencia significativa del tratamiento sobre la actividad enzimática, señalando diferencias significativas del grupo de 1 µg/mL frente al grupo control ($p \leq 0.05$).

Los resultados mostraron la menor actividad GST para el grupo expuesto a la concentración de 1 µg/mL de NP (NPS-NH₂). En cuanto a los grupos control y 0,1µg/mL, presentaron una actividad similar, siendo ligeramente inferior en el caso del grupo expuesto a 0,1µg/mL.

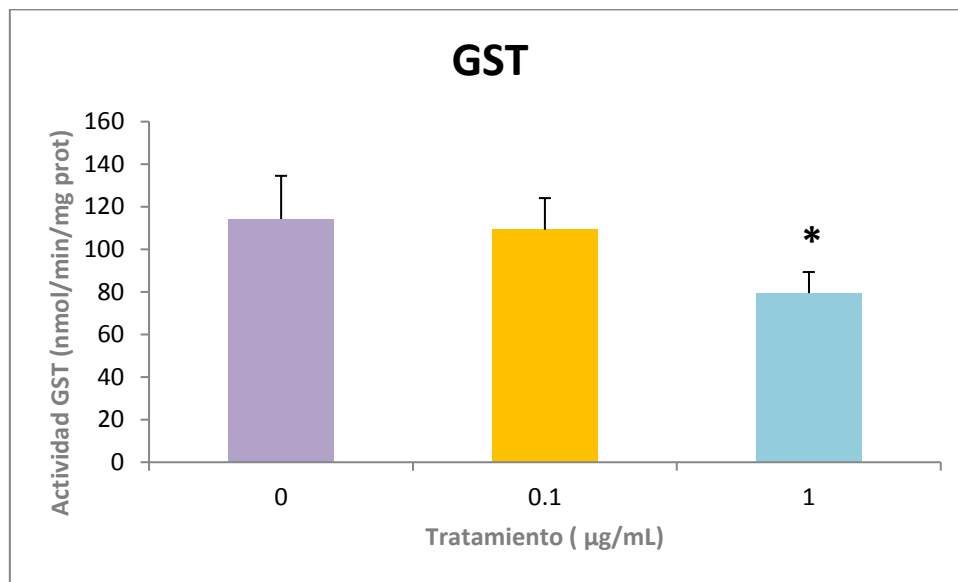


Figura 12. Actividad GST en *A. franciscana* tras 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) (0,1y 1µg/mL), junto con el grupo control (0µg/mL). (*) señala diferencias significativas entre grupos expuestos a NP respecto al control tras el resultado del análisis del ANOVA de una vía y el test *post hoc* con Dunnet ($p \leq 0.05$). Los datos se representan como medias \pm std (desviación estándar).

Carboxilesterasa

El análisis estadístico de la actividad CbE (ANOVA de una vía con test *post hoc* Dunnet) mostró una influencia significativa del tratamiento sobre la actividad enzimática, señalando diferencias significativas de los grupos tratados (0,1 y 1 µg/mL) frente al grupo control ($p \leq 0.05$).

Los resultados representados en la figura 13, muestran una mayor actividad CbE en el grupo expuesto a la concentración de 0,1 µg/mL, mientras que, la menor actividad se observó en el grupo expuesto 1 µg/mL.

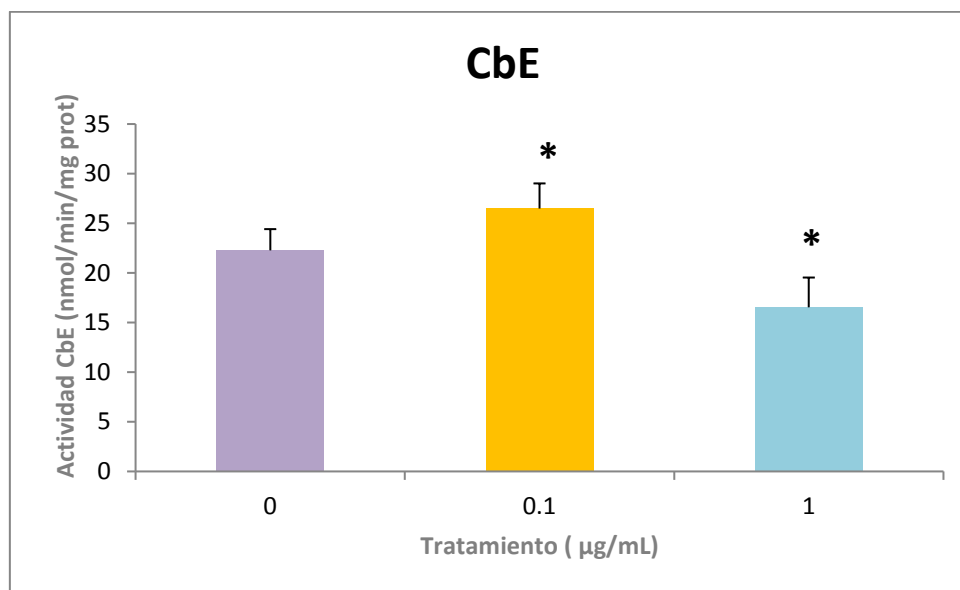


Figura 13. Actividad CbE en *A. franciscana* tras 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) (0,1y 1µg/mL), junto con el grupo control (0µg/mL). (*) señala diferencias significativas entre grupos expuestos a NP respecto al control tras el resultado del análisis del ANOVA de una vía y el test *post hoc* con Dunnet ($p \leq 0.05$). Los datos se representan como medias \pm std (desviación estándar).

5.5 Contenido en proteína total

En la figura 14 se observan los resultados del contenido en proteína total de los diferentes grupos experimentales, donde el análisis estadístico con ANOVA de una vía evidenció la existencia de diferencias significativas entre el grupo de concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ respecto al control ($p \leq 0,05$). El test *post hoc* Dunnett indica que hay diferencias significativas en el grupo expuesto a concentración 1 $\mu\text{g/mL}$, respecto al grupo control, presentando una cantidad de proteína total mayor. En cuanto al grupo de concentración 0,1 $\mu\text{g/mL}$ no existen diferencias significativas respecto al control, presentando un contenido en proteína total menor.

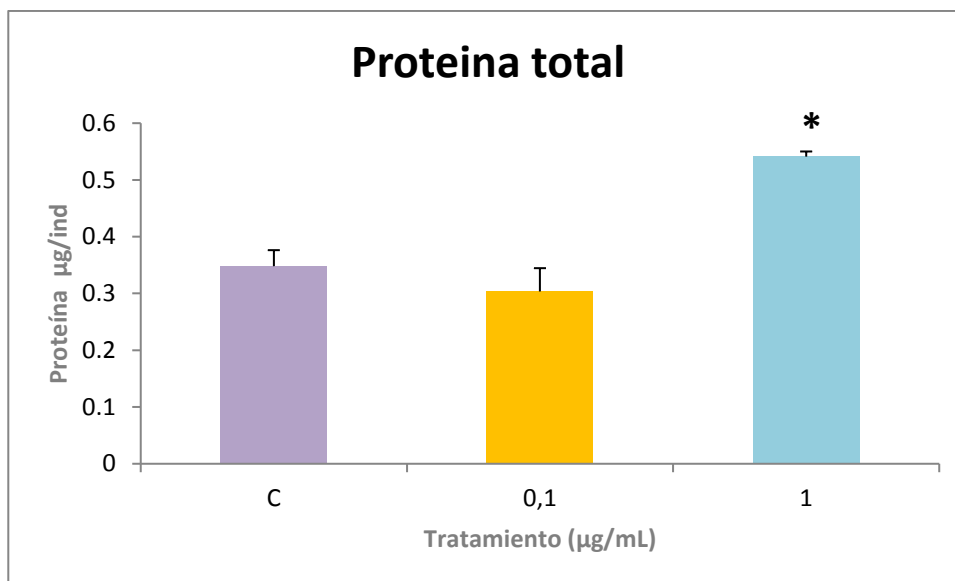


Figura 14. Proteína total en organismos de *A. franciscana* tras 14 días de exposición a dos concentraciones subletales de NP (NPS-NH₂) (0,1y 1 $\mu\text{g/mL}$), junto con el grupo control (0 $\mu\text{g/mL}$). (*) señala diferencias significativas entre grupos expuestos a NP respecto al control tras el resultado del análisis del ANOVA de una vía y el test *post hoc* con Dunnet ($p \leq 0.05$). Los datos se representan como medias \pm std (desviación estándar).

6. DISCUSIÓN

Tras el análisis de los efectos derivados de la exposición de *A. franciscana* a nanopartículas de poliestireno (NPS-NH₂) a concentraciones subletales durante un periodo crónico de 14 días, se observaron diversas respuestas.

Respecto al efecto sobre el crecimiento de los individuos, se observó un incremento hasta el noveno día de exposición, donde empezó a observarse como el grupo control presentaba un crecimiento menor respecto a los grupos expuestos, pero no de forma significativa. Al final de la exposición, el grupo expuesto a una concentración 1 µg/mL, experimentó mayor crecimiento que los grupos restantes, siendo el control el de menor crecimiento. Este hecho puede deberse al fenómeno de hormesis (Chapman, 2002), el cual es una adaptación de los organismos frente a niveles bajos de estrés, en la que los organismos no sólo reparan cualquier daño, sino que también sobrecompensan y reducen el daño de fondo más efectivo, es decir que, una dosis baja de nanoplásticos produce un pequeño estrés capaz de activar las respuestas adaptativas de *A. franciscana* e incrementar su resistencia frente a los NP (Chapman, 2002).

En relación a la supervivencia, se observó que en el grupo expuesto a 1 µg/mL de NP, sobrevivían una mayor cantidad de individuos que en el grupo control y el grupo expuesto a 0,1 µg/mL de NP (NPS-NH₂). Al principio del experimento la supervivencia disminuyó de forma constante en los tres grupos, hasta el día 9 de exposición, donde comenzó a observarse una mayor supervivencia en el grupo expuesto a 1 µg/mL, seguido del grupo control y el grupo expuesto a 0,1 µg/mL, que presentó el menor porcentaje de supervivencia. En contraposición, Varó y colaboradores (2015), analizaron los efectos provocados por el insecticida organofosforado clorpirifós en *A. franciscana* observando una mortalidad del 50% en la concentración más alta estudiada (5 µg/mL) a los 24 días de exposición. Esta diferencia puede deberse a que las concentraciones de nanoplásticos, empleadas en el presente estudio, no fueran lo suficientemente altas como para provocar una mortalidad excesiva en un periodo de 14 días, de tal forma que una potencial adaptación a las condiciones de contaminación por parte de los individuos, pudo darse lugar. Este efecto se observó al exponer a modo de prueba una concentración más alta de NP (10 µg/mL), la cual provocó en el segundo día de exposición, más de un 70% de mortalidad (datos no expuestos en el trabajo).

En el caso de la influencia de las NP sobre la tasa de filtración de los individuos a los 7 días de exposición, no se observó un gran efecto, ya que, el grupo expuesto a mayor concentración, presentó una mayor tasa de filtración respecto al grupo control. Por otro lado, la tasa de filtración se vio afectada a los 14 días de exposición, donde los individuos expuestos a mayor concentración de NP tenían una menor tasa de filtración, pudiéndose deber a la posible aglomeración de NP en el tubo digestivo, tal y como sucedió en el estudio de Bergami *et al.* (2016), donde observaron cómo se adherían NP (NPS-NH₂) en el tubo digestivo de *A. franciscana* limitando posiblemente, la ingesta de alimento. También observaron que después de 7 días de recuperación en un medio sin NP los individuos fueron capaces de expulsar totalmente las NPS-NH₂ del tubo digestivo.

Otro estudio en contraposición con el presente, Morant (2016) llevó a cabo un ensayo crónico durante 7 días de exposición con *A. parthenogenetica* a las mismas NP usadas en este estudio (NPS-NH₂) a concentraciones subletales (1 y 3 µg/mL) junto con un grupo control (0 µg/mL), donde la tasa de filtración de los organismos expuestos se vio afectada, y disminuía conforme aumentaba la concentración de NP.

Respecto a los efectos biológicos causados por la exposición a las NP, se obtuvieron diferentes respuestas a nivel bioquímico en los biomarcadores analizados.

En el análisis de la actividad ChE se observó un aumento significativo en el grupo expuesto a NPs (NPS-NH₂) a una concentración de 0,1 µg/mL, mientras que, en el grupo expuesto a concentración 1 µg/mL se obtuvo una actividad menor, siendo este último significativamente menor respecto al grupo control.

Perini (2016), evaluó los efectos de NPs de amino poliestireno catiónico (PS-NH₂ de 50 nm), y a las mismas concentraciones subletales (0, 0,1 y 1 µg/mL) utilizadas en el presente estudio, en nauplios de *A. franciscana* tras de una exposición aguda (48 h), y obtuvo unos resultados similares. La actividad ChE para el grupo expuesto a 0,1 µg/mL presentó una mayor actividad, mientras que en el caso del grupo expuesto a 1 µg/mL esta actividad fue menor. *Artemia* tolera niveles de inhibición altos de ChE (alrededor del 80%) sin efectos letales (Varó *et al.*, 2002). No obstante, puede causar la muerte si se produce una disminución de la movilidad, dañando las funciones fisiológicas, como respiración y alimentación, ya que se trata de un organismo filtrador (Varó *et al.*, 2002; Varó *et al.*, 2015).

La mayor actividad de ChE encontrada en el grupo expuesto a 0,1 µg/mL podría deberse a una posible inflamación, tal y como ocurre con la exposición a

ciertas nanopartículas metálicas (Gambardella *et al.*, 2014). La enzima ChE, activada de manera moderada, puede contribuir a la disminución de la inflamación, (Falugi y Aluigi, 2012) estimulando la regeneración tisular (Buzea *et al.*, 2007). No obstante, ésta hipótesis debe ser confirmada con más estudios.

En el análisis de la actividad GST se observó un aumento significativo en el caso del grupo expuesto a 1 µg/mL. El grupo expuesto a 0,1 µg/mL, presentó una menor actividad respecto al grupo control, pero no de forma significativa. Estos resultados muestran una posible inhibición de la enzima GST a medida que aumentan las concentraciones de NP (NPS-NH₂). Perini (2016), obtuvo unos datos similares al exponer nauplios de *A.franciscana* a idénticas concentraciones de NPs (PS-NH₂), durante 48h.

Al tratarse de una enzima de fase II, la cual cataliza la conjugación de los tóxicos con glutatión reducido (GSH) (Nunes *et al.*, 2006a), una posible inhibición de esta enzima puede indicar estrés celular, actividad detoxificadora (Jemec *et al.*, 2007) o incluso indicios de apoptosis.

La inhibición de la actividad de GST también se ha observado en diferentes especies de *Artemia* tras 48 horas de exposición a fármacos (Nunes *et al.*, 2006a), nanopartículas metálicas (Gambardella *et al.*, 2014), óxido de grafeno y nanotubos de carbono multiparalelos (Mesarič *et al.*, 2015).

Los resultados de actividad CbE obtenidos, mostraron mayores valores en el caso del grupo expuesto a 0,1 µg/mL. Sin embargo, para el grupo expuesto a 1 µg/mL se observaron los menores valores de actividad. Este hecho puede apuntar a una posible inhibición derivada de la exposición a una mayor concentración de nanopartículas (1 µg/mL), similar a lo ocurrido en el estudio de Perini (2016) donde se observó una disminución de la actividad CbE en nauplios de *A.franciscana* expuestos a NPs (PS-NH₂), respecto al grupo control, indicando que las NPs (PS-NH₂) influyeron en la actividad de la enzima CbE.

En definitiva, la inhibición de la enzima CbE puede generar una mayor cantidad de ésteres carboxílicos no metabolizado y biodisponibles que pueden ocasionar toxicidad derivando en daños fisiológicos.

En cuanto a los niveles de proteína total presentes en los grupos de estudio existe una buena correlación ($R^2 = 0,998$) entre el tamaño de los individuos y la cantidad de proteína. Se observaron mayores valores para el grupo expuesto a una concentración

1 µg/mL de NP respecto a los grupos restantes. En el caso del grupo expuesto a 0,1 µg/mL de NP, los valores fueron menores en comparación con los del grupo control. El hecho de que el grupo con tratamiento 1 µg/mL mostrara mayores niveles de proteína total, puede estar relacionado con su mayor talla y, consecuentemente, mayor peso corporal derivando en valores más altos para los individuos más grandes (1 µg/mL) y valores semejantes entre el grupo control y el grupo 0,1 µg/mL, los cuales presentaron una talla menor.

En general, no se vio un efecto de las concentraciones de nanoplásticos utilizadas en este estudio sobre el crecimiento, supervivencia, comportamiento alimenticio a los primeros 7 días. Sin embargo, los biomarcadores si que se vieron alterados por la exposición crónica de los individuos a las concentraciones de los NP ensayadas, y también el comportamiento alimenticio a los 14 días de exposición.

Un aumento de las concentraciones de nanoplásticos en ecosistemas acuáticos (ej. marinos e hipersalinos) podría suponer un riesgo ambiental para ciertas poblaciones de invertebrados acuáticos, y en especial para las especies del género *Artemia* que son un organismo clave en el funcionamiento de los ecosistemas hipersalinos, y cuyas poblaciones podrían disminuir, lo que implicaría una pérdida de biodiversidad. Además, en el caso de la especie *A. franciscana* una disminución de sus poblaciones en lugares donde se explotan quistes podría ser un riesgo en el futuro para el desarrollo de la acuicultura debido a la disminución o pérdida de este recurso natural explotable.

7. CONCLUSIONES

1. No se observó una relación entre la concentración de nanopartículas ensayadas y la supervivencia de los individuos expuestos.
2. La variable tiempo tuvo una influencia significativa sobre la talla de los individuos expuestos incrementándose a lo largo del bioensayo, mientras que la variable tratamiento no afectó al crecimiento.
3. La tasa de filtración se vio alterada significativamente por la variable tiempo, incrementándose a lo largo del bioensayo. Hubo una disminución del comportamiento alimenticio a los 14 días de exposición en los organismos con nanopartículas en el medio, pero no a los 7 días.
4. Todas las actividades enzimáticas analizadas, se vieron afectadas por la exposición a nanoplasticos. Por un lado la actividad glutatión-S-transferasa y la actividad colinesterasa se vieron solo afectadas en la concentración más alta ensayada (1 µg/mL). Mientras que la actividad carboxilesterasa se vio afectada por ambas concentraciones de nanoplasticos.
5. El aumento de contaminantes plásticos en el medio acuático, promueve la necesidad de llevar a cabo más estudios de toxicidad de nanoplasticos en *A.franciscana*, ya que se trata de una especie clave para la acuicultura.

8. LINEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Se hace patente la necesidad de llevar a cabo estudios más amplios de toxicidad con nanoplásticos, suministrando concentraciones más elevadas, ya que, en el presente estudio no se observaron efectos significativos a nivel fisiológico. Sería recomendable, introducir las concentraciones intermedias entre 1 – 10 $\mu\text{g/mL}$, como por ejemplo 3 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$, para verificar si ocasionan efectos negativos en *A. franciscana*.

Por otro lado sería interesante aumentar los días de exposición hasta que los organismos alcancen la edad adulta siendo reproductivamente activos, para poder observar si hay efectos provocados por los nanoplásticos en el comportamiento reproductivo de *A. franciscana*.

Por último, con el fin de comprobar los efectos interespecíficos, se podría añadir al diseño experimental otra especie de *Artemia*, además de la utilizada en este estudio. Con ello se podrían observar diferentes respuestas en función de la especie.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Amat, F. (1985). Utilización de *Artemia* en acuicultura. Informes técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras, 128-129, 1–60.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596–1605.
- Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M.L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K.A., Corsi, I. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 123, 18–25
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., & Ke, P. C. (2010). Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry C*, 114, 16556–16561.
- Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., & Donaldson, K. (2001). Size-dependent pro-inflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175, 191–199.
- Buzea, C., Blandino, P., & Robb, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, MR17–MR172.
- Chae, Y., & An, Y. (2017). Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 1–9.
- Chapman, P. M. (2002). Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *Science of The Total Environment*. 288, 131–140.
- Christoph, R., Muñoz, R., & Hernández, Á. (2016). Aspectos nano de los desechos de plástico. *Revista de Física*, No. 51E(51), 65–76.

- Comeche, A. (2015). Toxicidad del Metilparabeno en *Artemia Franciscana* y sus implicaciones en la acuicultura. Tesis de Master.
- Eubeler, J.P., Zok, S., Bernhard, M., Knepper, T.P., 2009. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. *Trend. Anal. Chem.* 28 (9), 1057–1072.
- Europe, P. (2015). Analysis of European plastics production , demand and waste data.
- Falugi, C., Aluigi, M. G., Chiantore, M. C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M. A., & Matranga, V. (2012). Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. *Marine Environmental Research*, 76, 114-121
- Gambardella, C., Mesarič, T., Milivojević, T., Sepčić, K., Gallus, L., Carbone, S., & Faimali, M. (2014). Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(7), 4249-4259.
- Golloway, Tamara S., Cole, Matthew,. & Lewis, Ceri. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. VI 1. *Nature Ecology and Evolution*. Review article.
- Haebi H. (1974),Catalase. In: Bergmeyer HV, editor. *Methods in enzymatic analysis*. Vol 2, New York: Academic press; p.674-84.
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Fournier, D., & Trebše, P. (2007). Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 68(8), 1408-1418
- Koelmans, A. A., Besseling, E., & Shim, W. J. (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment . Critical Review. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 325-340). Springer International Publishing.

- Lech, J.J., Vodcnik, M.J., (1985). Biotransformation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, 526–557.
- Libralato, G. (2014). The case of *Artemia* spp . in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research*, 101(September), 38–43.
- Lithner, D., Larsson, Å., & Dave, G. (2011). Science of the Total Environment Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of the Total Environment*, The, 409(18), 3309–3324.
- Martín, M., Gavil, J. T., & Varó, I. (2016). Evaluación de la toxicidad de metilparabeno en *Artemia franciscana*: efectos sobre crecimiento , supervivencia y biomarcadores, 103–118.
- Medina. (2002). Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae, 213, 15–29.
- Mesarič, T., Gambardella, C., Milivojević, T., Faimali, M., Drobne, D., Falugi, C., ... & Sepčić, K. (2015). High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. *Aquatic Toxicology*, 163, 121-129
- Morant Pérez, I. (2016). Efecto de los nanoplásticos sobre la supervivencia , crecimiento y fisiología de *Artemia parthenogenetica*. Tesis de Master.
- Nunes, B. (2011). *The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology*. *Review of Environmental Contamination and toxicology*. 212, 29-60.
- Nunes, B., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* 62, 581–594.

- Peakall, D.W., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1. 55-60.
- Perini, D. A. (2016). Impacts of nanoplastics on *Artemia franciscana* larvae : effects on growth and proteins responses.
- Redón, S. (2015). Parasitismo por cestodos en *Artemia* spp. y su implicación en la invasion biologica de *Artemia Franciscana* en la región Mediterranea.
- Rossi, G., Barnoud, J., & Monticelli, L. (2014). Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5, 241–246.
- Salvati, A., Aberg, C., dos Santos, T., Varela, J., Pinto, P., Lynch, I., *et al.* (2011). Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: Toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7, 818–826
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. Critical review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Varó, I., Navarro, J. ., Amat, F., & Guilhermino, L. (2002). Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*, 48, 563–569.
- Varó, I., Redón, S., Garcia-roger, E. M., Amat, F., Guinot, D., Serrano, R., & Navarro, J. C. (2015). Aquatic pollution may favor the success of the invasive species. *Aquatic Toxicology*, 161, 208–220.
- Viciano., E., & Biología, D. D. E. (2015). Optimización del enriquecimiento de nauplios de *Artemia* mediante el uso de emulsiones lipídicas formuladas a partir de aceites sintéticos ricos en DHA. Tesis Doctoral.

Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.

Vanhaecke, P., Sorgeloos, P., 1980. International Study on *Artemia*. IV. The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (eds) *The brine shrimp Artemia*, Vol.3, Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press, Wetteren, 393–405.