

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, BIOLOGÍA**  
**CELULAR, HISTOLOGÍA, HISTORIA DE LA CIENCIA, MEDICINA**  
**LEGAL Y FORENSE Y TOXICOLOGÍA**  
**Área de Toxicología**



**TRABAJO FIN DE MÁSTER. MÁSTER GESTIÓN INTEGRAL DEL**  
**AGUA**

**“TOXICIDAD DEL CLORPIRIFÓS Y TRICLOSÁN ASOCIADOS**  
**A MICROPLÁSTICO (CLORURO DE POLIVINILO) EN LA ESPECIE *Artemia salina*”**

**Tutoras: Prof. Dña M<sup>a</sup> Gemma Albendin García**  
**Prof. Dña Juana M<sup>a</sup> Arellano López**

**Alumna: M<sup>a</sup> Carmen González Gómez**

**Puerto Real 2018**

Dña. Juana M<sup>a</sup> Arellano López y Dña. M<sup>a</sup> Gemma Albendín García, Profesoras del Área de Toxicología, del Departamento de Anatomía Patológica, Biología Celular, Histología, Historia de la Ciencia, Medicina Legal y Forense y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz.

INFORMAN: que la alumna del Máster de Gestión Integrada del Agua **Dña. Carmen González Gómez**, ha realizado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales del Departamento de Anatomía Patológica, Biología Celular, Histología, Historia de la Ciencia, Medicina Legal y Forense y Toxicología de la Universidad de Cádiz, el trabajo titulado **"Toxicidad del clorpirifós y triclosán asociados a microplástico (Cloruro de polivinilo) en la especie *Artemia salina*"** bajo nuestra dirección y que presenta para optar al Grado de Máster.

Y para que así conste, firmamos la presente en Puerto Real a 18 de septiembre de 2018:



Fdo. Dra. Juana M<sup>a</sup> Arellano López



Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Gemma Albendín García

## ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
Agua MilliQ	Agua bidestilada y desionizada
ANOVA	Análisis de varianza
ASCh	Acetiltiocolina
B	Blanco de agua salina
BA	Blanco del disolvente acetona en agua salina
BSA	Albumina sérica bovina
CPF	Clorpirifós
CPF+MP	Clorpirifós asociado a microplástico
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EPA-USA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América
g	fuerza centrifuga relativa
g	gramo
h	hora
$K_2Cr_2O_7$	Dicromato potásico
l	litro
LC <sub>50</sub>	Concentración letal 50
24h-LC <sub>50</sub>	Concentración letal 50 con un tiempo de exposición al toxico de 24 horas
48h-LC <sub>50</sub>	Concentración letal 50 con un tiempo de exposición al toxico de 48 horas
96h-LC <sub>50</sub>	Concentración letal 50 con un tiempo de exposición al toxico de 96 horas
M	Molar
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro

mm	milímetro
MP	microplástico
μl	microlitro
μm	micrómetro
nm	nanómetro
nmol	nanomol
°C	grado centígrado
OCDE	Organización para Cooperación y Desarrollo Económico
PVC	Cloruro de polivinilo
p	probabilidad
SR	Solución de reacción
TF	Tampón fosfato 0.1 Molar (pH 7,4)
TCS	Triclosán
TCS+MP	Triclosán asociado a microplástico
TNB	5-tio-2 nitro-benzoico
UCA	Universidad de Cádiz

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

Figura 1. Imagen al microscopio óptico de <i>A. salina</i> con un aumento total de 40x.....	8
Figura 2. Microplaca donde se realizó ensayo de toxicidad con $K_2Cr_2O_7$ .....	12
Figura 3. Envases de vidrio donde se realizó el ensayo de toxicidad de CPF, CPF+MP, TCS y TCS+MP.....	14
Figura 4. Imagen de MP al microscopio óptico. A: MP con un aumento total de 40x, B: MP con un aumento total de 100 x.....	17
Figura 5. Imagen al microscopio óptico de <i>A. salina</i> expuesta 48 horas en agua de mar. A: Imagen al microscopio con un aumento total de 40x, B: Imagen al microscopio con un aumento total de 100x.....	18
Figura 6. Imagen al microscopio óptico de <i>A. salina</i> expuesta 48 horas en medio con una concentración de 325 mg/l de MP en agua salina. A: Aumento total 100x, B: Aumento total 100 x.....	18
Figura 7. Imagen al microscopio óptico de <i>A. salina</i> expuesta 48 horas a una concentración 26 mg/l de MP en agua salina. A: Aumento total de 40 x, B: Aumento total de 100 x.....	19
Figura 8. Imagen al microscopio óptico de <i>A. salina</i> expuesta 48 horas en un medio con concentración 0,26 mg/l de MP en agua salina. A: aumento total de 40 x, B: aumento total de 100 x.....	19
Figura 9. Imagen al microscopio óptico (aumento total 100 x) de <i>A. salina</i> expuesta 48 horas en un medio con concentración 0,26 mg/l de MP en agua de mar (control MP en ensayo CPF+MP).....	20

## ÍNDICE DE TABLAS

## Página

Tabla 1. Mortalidad de <i>A. salina</i> expuesta al tóxico de referencia ( $K_2Cr_2O_7$ ) durante 24 horas.....	22
Tabla 2. Ensayo toxicidad CPF. Mortalidad de <i>A. salina</i> expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.....	23
Tabla 3. Ensayo toxicidad CPF+MP. Mortalidad de <i>A. salina</i> expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.....	23
Tabla 4. Ensayo toxicidad TCS. Mortalidad de <i>A. salina</i> expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.....	24
Tabla 5. Ensayo toxicidad TCS+MP. Mortalidad de <i>A. salina</i> expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.....	24
Tabla 6. Valores de 48h-LC <sub>50</sub> e intervalos de confianza para <i>A. salina</i> adulta, expuesta a distintos tóxicos (CPF, CPF+MP, TCS, TCS+MP).....	25
Tabla 7. Actividad específica colinesterasa de <i>A. salina</i> en ensayo de exposición a CPF y CPF+MP durante 48 h. Los resultados son expresados como medias $\pm$ errores estándar. Siendo n el numero de muestras. - No sobrevivió ningún espécimen.....	26
Tabla 8. Actividad específica colinesterasa de <i>A. salina</i> en ensayo de exposición a TCS y TCS+MP durante 48 h. Los resultados son expresados como medias $\pm$ errores estándar. Siendo n el numero de muestras. - No sobrevivió ningún espécimen.....	27

<b>INDICE</b>	<b>pagina</b>
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	9
2. 1. Generales.....	9
2. 2. Específicos .....	9
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b> .....	10
3. 1. Organismos.....	10
3. 2. Agua de mar.....	10
3. 3. Compuestos químicos.....	10
3. 4. Ensayos previos de ingestión de MP.....	10
3. 5. Determinación de la Toxicidad Aguda: Concentración letal 50 (LC <sub>50</sub> ).....	11
3.5.1. Pruebas previas para evaluar la calidad de la población. Determinación de LC <sub>50</sub> con toxico de referencia.....	11
3.5.2. Ensayos de Toxicidad de las sustancias a ensayar. Determinación de LC <sub>50</sub> .....	12
3.6. Preparación de las muestras para determinación de la actividad colinesterasa.....	14
3.7. Determinación de la actividad colinesterasa.....	14
3.8. Determinación de proteínas.....	15
3.9. Análisis estadístico.....	16
<b>4. RESULTADOS</b> .....	17
4. 1. Examen previo de ingestión de microplástico.....	17
4. 2. Examen de ingestión de MP en ensayo CPF+MP y TCS+MP.....	19
4. 3. Toxico de referencia. Determinación LC <sub>50</sub> .....	20
4. 4. Toxicidad de la sustancias objeto del ensayo . Determinación LC <sub>50</sub> .....	20
4. 5. Determinación colinesterasa.....	25
<b>5. DISCUSION</b> .....	28
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	32





## RESUMEN

En las últimas décadas los microplásticos, productos farmacéuticos, insecticidas, han emergido como importantes contaminantes de sistemas acuáticos. El conocimiento de los efectos de estos productos sobre organismos acuáticos es limitado, especialmente los causados por sus mezclas. Es por esto que el objetivo principal de nuestro trabajo fue investigar si la presencia de microplástico (cloruro de polivinilo) influye en la toxicidad del clorpirifós (insecticida) y triclosán (antibacteriano) cuando coinciden en el medio, utilizando como bioindicador *Artemia salina* en fase de desarrollo adulto.

Se calculó la  $LC_{50}$  y la actividad de la enzima colinesterasa para comprobar la posible neurotoxicidad asociada a los distintos tratamientos. Los valores de  $LC_{50}$  obtenidos fueron: 0,006 mg/l para clorpirifós, 0,012 mg/l para clorpirifós asociado a microplástico, 4,979 mg/l para triclosán y 4,957 mg/l en triclosán asociado a microplástico. Estos resultados indican que el microplástico no aumenta la toxicidad, incluso en el caso del clorpirifós asociado a microplástico se observa una tendencia a disminuir.

Las distintas exposiciones al clorpirifós solo y asociado a microplástico muestran una disminución de la actividad de la enzima colinesterasa, lo que confirma su efecto neurotóxico. No se observó esta disminución del biomarcador colinesterasa en el caso del triclosán.

## ABSTRACT

In the last decades, microplastics, pharmaceuticals products, insecticides, have emerged as important pollutants of aquatic systems. Knowledge of the effects of these products on aquatic organisms is limited, especially those caused by their mixtures. The main objective of our work was to investigate whether the presence of microplastic (polyvinyl chloride) influences the toxicity of chlorpyrifos (insecticide) and triclosan (antibacterial) when they coincide in the medium. The test was carried out with the bioindicator *Artemia salina* (adult).

The acute toxicity was determined by calculating the  $LC_{50}$  and the cholinesterase activity to check the possible neurotoxicity associated with the different treatments. The values  $LC_{50}$  were: 0.006 mg / l for chlorpyrifos, 0.012 mg / l for chlorpyrifos with microplastic, 4.979 mg / l for triclosan and 4.957 mg / l in triclosan associated with microplastic.

It was not observed that the microplastic increased the toxicity, even in the case of chlorpyrifos the association decreased it. The different exposures to chlorpyrifos alone and

associated with microplastic produced a decrease in the cholinesterase activity, confirming its neurotoxic effect. This decrease in the cholinesterase biomarker was not observed in the case of triclosan.

Palabras clave: *A. salina*, microplástico, triclosán, clorpirifós, toxicidad.

keywords: *A. salina*, microplastic, triclosan, chlorpyrifos, toxicity.

## 1. INTRODUCCION

En la actualidad, los sistemas acuáticos presentan en algunos casos un importante deterioro. La intervención humana es la principal fuente de contaminación del agua, la actividad doméstica, industrial y agrícola, emplea y produce gran cantidad de sustancias, como insecticidas, antibacterianos, plásticos, etc., responsables muchos de ellos de la contaminación ambiental.

Dentro de los insecticidas uno de los más empleados ha sido el Clorpirifós (CPF). Esta sustancia se ha utilizado principalmente como insecticida para combatir plagas de insectos, parásitos del ganado y como aerosol para controlar microorganismos patógenos en agricultura.

Clorpirifós de fórmula O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotionato, se presenta como cristales sólidos cuyo color oscila entre incoloro y blanco amarillento. Tiene un coeficiente de partición octanol: agua de 4,82 y presenta una solubilidad en agua de 1,4 mg/l a 25°C [1].

Se puede absorber por inhalación a partir de aerosoles, a través de la piel y por ingestión. Resulta muy tóxico para los organismos acuáticos, insectos y algunas especies de aves. El principal lugar de actuación del CPF es sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de hidrolizar a la acetilcolina. El grupo fosfato del CPF fosforila al hidroxilo del aminoácido serina de la AChE, impidiendo que la misma actúe sobre la acetilcolina. La unión entre el fósforo y la enzima es mucho más fuerte y estable que la que se establece entre el carbono del acetato de la acetilcolina y la enzima, lo cual determina que la desfosforilación, o sea la recuperación de la enzima, se realice a una velocidad sumamente lenta, lo que prácticamente equivale a una inhibición de carácter irreversible [2]. Además puede actuar sobre el sistema redox celular, aumentando especies reactivas de oxígeno, lo que podría producir mutaciones. Así cómo comportarse como un disruptor endocrino modulando la acción de los estrógenos [3].

El CPF es una sustancia que tiende a unirse firmemente a las partículas del suelo y al ser insoluble en agua, no suele infiltrarse en profundidad por lo que no suele provocar contaminación de las aguas subterráneas. Este compuesto se evapora con facilidad y puede provocar episodios de contaminación a largas distancias, sin embargo es fácilmente degradable por la luz solar, algunas bacterias y otros procesos químicos [4].

En el grupo de los antibacterianos, una sustancia que se encuentra en la composición de numerosos productos utilizados en nuestra vida cotidiana como jabones, champús, detergentes, desodorantes, artículos del hogar, aditivo en envases, textiles, etc., es el triclosán (TCS) de fórmula 5-cloro-2 (2,4-diclorofenoxi)-fenol, es un polvo blanco, presenta un coeficiente partición octanol: agua de 4,76 y una solubilidad en agua de 10 mg/l a 20 °C [5].

Con propiedades antibacterianas y fungicidas, esta sustancia se libera con el enjuague de los productos mencionados anteriormente, llegando a la red de alcantarillado, y a partir de ahí a las estaciones depuradoras, que vierten a ríos y mares pudiendo constituir una fuente importante de contaminación [6], ya que la exposición a TCS presenta toxicidad en organismos acuáticos [7].

Las vías de ingreso de TCS en el humano son por contacto con la piel, las mucosas y a través del tracto gastrointestinal, debido a que este compuesto es rápidamente metabolizado y excretado a través de la orina, tiene una baja probabilidad de generar efectos tóxicos de tipo genotóxicos, teratogénicos, mutagénicos o carcinogénicos al utilizar productos que contengan TCS. No obstante, el TCS presenta similitud estructural con hormonas tiroideas y con disruptores androgénicos y estrogénicos [8].

Su mecanismo de acción como antibacteriano se basa en la disrupción de la membrana a través del bloqueo de la síntesis de lípidos. Inhibe la proteína transportadora enoil-acilreductasa, la cual participa en la biosíntesis de ácidos grasos necesarios para la formación de membranas celulares y en la reproducción de bacterias [9].

Otras de las sustancias que en las últimas décadas han adquirido protagonismo como contaminantes, son los plásticos, dadas sus características han reemplazado a los materiales tradicionales (metal, madera, caucho, vidrio y papel) convirtiéndose en materiales ampliamente utilizados y cuya cifra de producción crece cada año. Según el último informe de Plastics Europe (2017) la cantidad de plásticos generados en el mundo en 2015 fue de 322 millones de toneladas, aumentando esa cifra en 2016 a 335 millones de toneladas, en Europa fue de 58 en 2015 y de 60 millones de toneladas en 2016. Los productos más demandados por los transformadores fueron, polietileno de distintas densidades seguido de polipropileno y cloruro de polivinilo (PVC) [10].

Al final de su vida útil, los plásticos se convierten en residuos, pudiendo alcanzar el medio acuático, tanto el mar como los ríos [11,12].

Los residuos de plástico (principal componente de las basuras marinas) se pueden diferenciar en macroplásticos y microplásticos (MPs). Este segundo tipo puede formarse a

partir de plásticos más grandes tanto por degradaciones físicas (mecanización de las olas, efectos de temperatura o radiación ultravioleta) como por, degradaciones químicas (oxidación, hidrólisis), reduciendo el plástico a partículas y fibras más pequeñas. También pueden encontrarse en el medio marino otros MPs producidos intencionalmente para su uso directo, por ejemplo partículas granulares utilizadas como abrasivos en los cosméticos, o precursores de otros productos "pellets" [13].

Aunque hay discrepancias sobre el rango de tamaños para la definición de estas partículas, de forma genérica, los MPs comprenden todas aquellas partículas de plástico con un tamaño inferior a 5 mm [14]. Algún autor [11] apunta la necesidad de emplear tres términos diferentes para tres rangos de tamaño por debajo de los 5 mm, en función de las distintas características físicas y los impactos biológicos que éstos ocasionan: mesoplásticos (500  $\mu\text{m}$  – 5 mm), microplásticos (50-500  $\mu\text{m}$ ) y nanoplásticos (<50  $\mu\text{m}$ ).

Los MPs por sí mismos son considerados como contaminantes debido a su gran persistencia en el medio. Al no ser degradados por los microorganismos persisten en la columna de agua y en los sedimentos, yendo su concentración en aumento junto con su biodisponibilidad.

Además, también actúan como acumuladores de otros contaminantes químicos, bien sean compuestos directamente relacionados con la fabricación de estos para proporcionarles ciertas propiedades (aditivos), o sustancias con las que coincide en el medio y con las que pueden interactuar, como ejemplo metales pesados (mercurio, cromo) [15,16] o contaminantes orgánicos hidrófobos que se adsorben sobre ellos, como pudiera ser el caso del insecticida CPF y el antimicrobiano TCS.

Por tanto la ingestión de MP por parte de la fauna constituye un motivo de preocupación, ya que puede proporcionar una vía para la introducción de productos químicos peligrosos en la cadena trófica [17].

Aún se desconoce mucho sobre los MPs y sus riesgos, pero esta capacidad de actuar como vectores o transportadores de los contaminantes orgánicos, debido al carácter hidrófobo que presentan y a su persistencia en el medio, constituye un motivo de preocupación e investigación.

Para investigar estos problemas se llevan a cabo bioensayos que permiten determinar el impacto ambiental de estas sustancias. En estos ensayos los efectos tóxicos a evaluar suelen ser: mortalidad, inmovilidad, alteración del comportamiento, alteraciones de parámetros biológicos, etc.

Uno de los organismos utilizados, para realizar estos bioensayos son especies del género *Artemia sp* por su importancia ecológica, ensayos de bajo coste, fácil manipulación y obtención de poblaciones homogéneas a partir de hidratación de quistes desecados.

Los estudios de toxicidad estandarizados son usualmente realizados con organismos neonatos o juveniles, ya que se les reconoce mayor sensibilidad que a los adultos, asegurando así la obtención de resultados con mayores niveles de seguridad frente a las exposiciones. Así, la sensibilidad a los distintos contaminantes en organismos invertebrados quedaría establecida como formas larvianas > formas juveniles > formas adultas [18]. Aunque esto último en algunos trabajos no ha sido observado [19].

El género *Artemia* (Clase: *Crustacea*, Subclase: *Brachipoda*, Orden: *Anostraca*, Familia: *Artemidae*). Está formado por seis especies bisexuales, *Artemia salina* descrita por Leach en 1819, *A. urmiana*, *A. sinica*, *A. tibetiana*, *A. franciscana* y *A. persimilis*. Las poblaciones partenogénicas se agrupan taxonómicamente bajo una única especie: *A. parthenogenetica*.

Las especies presentan dimorfismo sexual, como rasgos morfológicos característicos presentan los siguientes: una cabeza formada por cinco segmentos fusionados, en la que se observan los ojos compuestos, un ocelo frontal entre estos, las anténulas o antenas secundarias, y las antenas, también llamadas antenas verdaderas, y que en el caso de los machos se hipertrofian en apéndices prensiles. El tórax lo constituyen once segmentos, cada uno de ellos dotado de un par de apéndices aplanados, llamados filópodos o toracópodos. El abdomen está constituido por ocho segmentos, los dos primeros los genitales, y el último llamado telson, provisto de la furca caudal (Figura 1).

*Artemia* presenta dos tipos de reproducción: bisexual, con presencia de machos y hembras. Y partenogénica, donde la presencia de machos es testimonial. Ambas modalidades se excluyen y no se ha encontrado ninguna cepa o variedad que pueda alternar cíclicamente ambas formas.

Tanto en las poblaciones bisexuales como en las partenogénicas, las hembras pueden dar lugar a dos tipos de huevos:

- a) los que completan el desarrollo embrionario en el interior del útero, por lo que resultan en un nauplio completamente formado (proceso ovovivíparo).
- b) los que detienen su desarrollo quedando en forma de quiste (proceso ovíparo).

Cuando los quistes deshidratados son rehidratados de nuevo en agua de baja salinidad, con adecuados niveles de aireación e iluminación, los embriones enquistados continúan su desarrollo hasta eclosionar en forma de nauplio completamente formado, al que sigue el

estado larvario II en el que ya empieza a capturar alimento externo, y con el que se entra a las formas metanaupliares que darán paso a las fases juveniles y adultas [20, 21]. La fase adulta se alcanza de 14 a 25 días, varía dependiendo de la especie y de factores externos.

*Artemia salina* habita exclusivamente en ecosistemas salinos. La temperatura vital óptima está alrededor de 25-27 °C. Puede soportar niveles bajos de oxígeno en el agua.

En cuanto a su alimentación es un crustáceo filtrador pasivo que ingiere partículas en un rango de tamaño de 1 a 50  $\mu\text{m}$ . Se alimenta de la captura de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritus del medio en que vive, lo que lleva a cabo mediante movimientos de sus apéndices, creando una corriente, la cual conduce al alimento hasta la boca del animal. Este mecanismo es evidente en las formas adultas de *Artemia*, las formas naupliares se nutren de las reservas vitelinas, hasta el estado II a partir del cual el alimento es capturado por filtración mediante las segundas antenas. A medida que los telopoditos de los filópodos se van desarrollando paulatinamente, se incorporan a estas funciones [20, 21].



Figura 1. Imagen al microscopio óptico de *A. salina* con un aumento total de 40 x.  
(Fuente: elaboración propia)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 General:**

Investigar si la presencia del microplástico (MP), en concreto PVC, puede influir en la toxicidad del plaguicida (CPF) y del biocida (TCS) sobre adultos de *A. salina*.

### **2.2 Específicos:**

Comprobación de la ingestión del MP por parte de *A. salina* a diferentes concentraciones (325 mg/l, 26 mg/l y 0,26 mg/l).

Determinación de la actividad colinesterasa en *A. salina*, expuesta a la presencia de los tóxicos: CPF solo y asociado a MP (CPF+MP) y TCS solo y asociado a microplástico (TCS+MP).



### **3. MATERIALY METODOS**

#### **3.1. Organismos.**

Como indicador biológico se emplearon especímenes adultos de *A. salina* de cuatro semanas de vida, que fueron proporcionados por el Servicio de cultivos marinos de la Universidad de Cádiz (UCA) con número de registro CA/3/U en la Sección de establecimiento de usuario y CA/3/CS en la sección de establecimiento de cría y suministro de animales de experimentación de la Comunidad Autónoma de Andalucía.

#### **3.2. Agua de mar.**

El agua de mar utilizada en el ensayo fue proporcionada por el Servicio de cultivos marinos de la UCA.

#### **3.3. Compuestos químicos.**

5-cloro-2(2,4-diclorofenoxi)-fenol (Triclosán), (CAS N° 3380-34-5 de Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).

O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotionato (Clorpirifós), (CAS N° 2921-88-2 de Chem Services, West Chester, PA, USA).

Acetona grado analítico, (CAS N° 67-64-1 de Merck).

Dicromato potásico purísimo ( $K_2Cr_2O_7$ ), (CAS N° 7778-50-9 de Panreac).

Cloruro de polivinilo de bajo peso molecular en polvo (PVC), (CAS N° 9002-86-2 densidad 1,4 g/ml de Aldrich).

Yoduro de acetiltiocolina 98% (ASCh), (CAS N° 2260-50-6 de Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).

Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), (CAS N° 9-78-3 de Merck).

Di-sodio hidrogeno fosfato anhidro, (CAS N° 7558-79-4 de Merck).

Sodio dihidrogeno fosfato monohidrato, (CAS N° 10049-21-5 de Merck).

Bio-Rad Protein Assay (Dye Reagent concentrate), (Bio-Rad)

Albúmina Sérica Bovina (BSA), (Bio-Rad).

#### **3.4. Ensayos previos de ingestión de MP.**

Se expusieron 10 especímenes de *A. salina* adultos, durante 48 horas a concentraciones de 325 mg/l, 26 mg/l y 0,26 mg/l del MP a estudiar en agua de mar, además de un control que solo contenía agua de mar. El ensayo se llevo a cabo por triplicado.

Finalizado el tiempo de exposición, se realizó un examen en fresco de las *A. salina* que sobrevivieron con la intención de observar en el sistema digestivo la presencia de MP. Se colocaron en portaobjetos añadiendo en algunos casos una gota de lugol al 20% y tras cubrirlas con un cubreobjetos se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 4 (4 x) y 10 (10 x) aumentos.

### **3. 5. Determinación de la Toxicidad aguda: Concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>).**

Un indicador para conocer la toxicidad de una sustancia, es la concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>), que se define como la concentración a la cual mueren el 50% de los organismos que son expuestos a una sustancia tóxica en un tiempo determinado.

3.5.1. Pruebas previas para evaluar la calidad de la población. Determinación de LC<sub>50</sub> con tóxico de referencia.

Como tóxico de referencia se empleó K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Se preparó una solución stock, pesando 0,1 g. de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> que se disolvió en 10 ml de agua MilliQ. A partir de esta solución stock, se prepararon por dilución seriada en agua de mar, siete disoluciones con concentraciones decrecientes del tóxico de: 80mg/l, 40mg/l, 20mg/l, 10mg/l, 5mg/l, 2,5mg/l y 1,25 mg/l.

El ensayo de toxicidad se realizó en microplaca de 12 pocillos con 5 ml de capacidad máxima cada uno (Figura 2). Se distribuyeron 4 ml de las distintas concentraciones a testar y un blanco de agua de mar en 3 pocillos y en cada pocillo se pusieron 4 organismos adultos. Todo este proceso se hizo por triplicado utilizándose un total de 36 ejemplares de *A. salina* por cada concentración. Se taparon las placas para evitar evaporación. El ensayo se realizó a 20 °C de temperatura exterior, fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad y a los individuos no se les suministro alimento alguno. La duración del ensayo fue de 24 horas, pasadas las cuales se anotaron los organismos vivos y muertos, considerando que estaban muertos aquellos que no presentaban movimiento.



Figura 2. Microplaca donde se realizó ensayo de toxicidad con  $K_2Cr_2O_7$   
(Fuente: elaboración propia)

### 3.5.2. Ensayos de Toxicidad de las sustancias a ensayar. Determinación de $LC_{50}$ .

Se prepararon soluciones stock de CPF y TCS, para lo cual se pesaron 0,3 g de TCS que se disolvieron en 10 ml de acetona y 50 mg de CPF que se disolvieron en 10 ml de acetona debido a la escasa solubilidad en agua de ambos.

Para la suspensión stock del MP, se pesaron 26 mg de PVC en polvo y se añadieron a 10 ml de agua MilliQ.

Las soluciones de ensayo se prepararon por diluciones seriadas a partir de las soluciones stock y agua de mar.

Tras ensayos previos, se eligieron las siguientes concentraciones a ensayar: 12 mg/l, 6 mg/l, 3 mg/l, 1,5 mg/l y 0,75 mg/l para el TCS. Y de: 0,0312 mg/l, 0,0156 mg/l, 0,0078 mg/l, 0,0039 mg/l y 0,00195 mg/l para el CPF.

La concentración elegida para el MP fue de 0,26 mg/l, se eligió esta concentración de MP por ser ecológicamente relevante según la bibliografía consultada [15].

En una primera sesión se llevó a cabo la exposición de los organismos a concentraciones crecientes de CPF solo y CPF+MP, para posteriormente en una segunda sesión realizar la exposición a TCS solo y TCS+MP.

La realización de los ensayos se hicieron siguiendo las pautas de la guía de la Organización para Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) número 202 [22], con algunas modificaciones, evaluando la inmovilización/muerte de *A. salina*.

Se distribuyeron 20 ml de cada una de las concentraciones a ensayar de CPF y TCS, en dos frascos de vidrio de 25 ml de capacidad máxima (Figura 3). En uno de los frascos se añadió 2 µl de la suspensión stock de MP, previamente agitada y transferida inmediatamente, lo que resultaría en una concentración final de MP de 0,26 mg/l en cada una de las distintas concentraciones de CPF+MP y TCS+MP. El ensayo se realizó por triplicado e igualmente se añadió por triplicado un blanco de agua de mar (B), un blanco del disolvente acetona (BA) (que contenía la misma cantidad de acetona presente en la concentración más alta a testar) y un control del MP en agua de mar (0,26 mg/l).

Posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur, en cada envase se añadían al azar 10 *A. salina* adultas de cuatro semanas de vida, que presentaban un tamaño similar (aproximadamente 6-7 mm). Los frascos se cerraron con tapón para evitar la evaporación del medio.

Las soluciones de ensayo se cambiaron cada 24 horas. Se midieron los valores de pH y saturación de oxígeno al principio y al final del test en los controles, y en las concentraciones más altas de las ensayadas mediante la utilización de la sonda multiparamétrica HANNA HI 9829.

Durante el tiempo de exposición a las *A. salina* no se suministro alimento. Se mantuvieron a una temperatura exterior de aproximadamente 20 °C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. La duración del ensayo fue de 48 horas.

Terminado el ensayo, se contabilizaron los especímenes vivos y muertos, considerando como muertos aquellos que no mostraban movimiento alguno tras estímulo mecánico.

Los organismos que sobrevivieron de cada concentración del ensayo de CPF y TCS fueron transferidos a tubos Eppendorf y congelados para su procesado posterior. Asimismo, los organismos vivos de los ensayos que testaban CPF+MP y TCS+MP fueron examinados en fresco al microscopio óptico, para tratar de visualizar la presencia de MP en su sistema digestivo, después se transfirieron a tubos Eppendorf y se congelaron a -20 °C hasta su análisis.

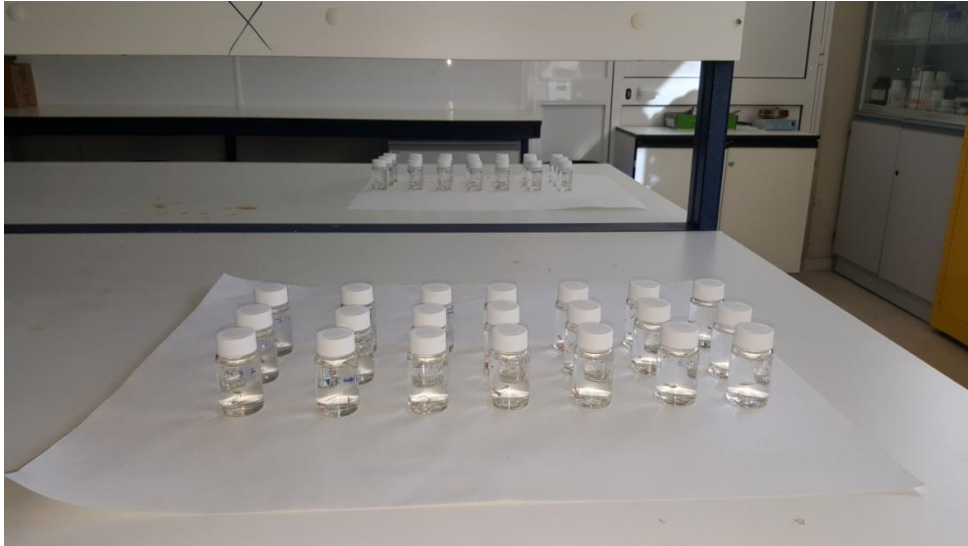


Figura 3. Envases de vidrio donde se realizó el ensayo de toxicidad de CPF, CPF+MP, TCS y TCS+MP (Fuente: elaboración propia)

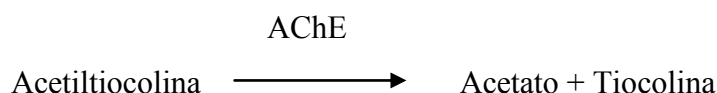
### **3.6. Preparación de muestras para determinación de la actividad colinesterasa.**

Los organismos vivos que habían sido congelados, se descongelaron y se les añadió una vez descongelados tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), a razón de 100  $\mu$ l por cada *A. salina*. Posteriormente las muestras se homogeneizaron con ayuda de un homogenizador de alta velocidad Ultra-Turrax (Schott Ibérica) en frío, durante 1 minuto. Los homogeneizados fueron centrifugados a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada Heraeus Megafuge 1.0R. Una vez centrifugados, se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf, constituyendo la muestra sobre la que determinar la actividad colinesterasa, descartándose el sedimento.

### **3.7. Determinación de la actividad colinesterasa.**

La inhibición de la enzima colinesterasa ante la presencia de pesticidas organofosforados y carbamatos, es una característica que ha permitido su utilización como biomarcador [23, 24].

La medida de la actividad enzimática se basa en la siguiente reacción descrita por Ellman y col. [25], donde la actividad enzimática es medida por el incremento de color (amarillo) producido por 5-tio-2 nitro-benzoico (TNB), indicador de la cantidad de sustrato ASCh hidrolizado por la enzima.



La actividad colinesterasa se determinó siguiendo el método de Ellman [25], modificado para microplacas según Guilhermino y col. [26] y siguiendo los tiempos de incubación de Varó y col [27]. Para realizar el ensayo se usó una microplaca con 96 pocillos. En cada pocillo se depositó, con ayuda de una micropipeta, 50 µl de cada muestra y 250 µl de la solución de reacción (SR) que contenía 30 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), 1 ml de Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzónico) (DTNB) 0,01 M, preparado en dicho tampón, y 0,2 ml del sustrato acetiltiocolina (ASCh) 0,2 M disuelta en agua MilliQ.

En cada experimento se midió un blanco sin muestra para estimar la velocidad de hidrólisis espontánea del sustrato y un segundo blanco sin sustrato para evaluar la reacción de los tioles con el DTNB. En el primer caso, en el pocillo de la microplaca se sustituyó la muestra por tampón fosfato, mientras que en el segundo, la mezcla de reacción usada para adicionar al pocillo fue preparada sin sustrato. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Tras mezclar el contenido de cada pocillo, se incubó en oscuridad durante 15 minutos. La velocidad de reacción enzimática se cuantificó mediante un lector de microplacas de Bio-Rad, modelo Benchmark Plus, midiendo la absorbancia a 415 nm.

La actividad enzimática, se expresó como nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto por mililitro (nmol/min ml). La actividad enzimática fue calculada según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática (nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}) = \left( \frac{V}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta DO / \text{min} \right)$$

Siendo V el volumen total de la mezcla en el pocillo (ml), v el volumen del extracto utilizado, d el paso de luz en la microplaca (0,874 cm), ΔDO/min el incremento de densidad óptica por minuto y ε el coeficiente de extinción molar del TNB (13600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

La actividad específica se determinó a partir del cociente:

$$\text{Actividad específica (nmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}) = \frac{\text{Actividad (nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1})}{\text{concentración de proteínas (mg mL}^{-1})}$$

### 3.8. Determinación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford adaptado a microplacas [28], usando para ello, el Kit comercial de BioRad y usando Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar. El método se basa en la unión de un colorante, el Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas. La disolución del colorante libre, en disolución ácida, es de color rojizo (máxima absorción a 465 nm) y cambia al azul (máxima absorción a 595 nm) cuando se une a las proteínas. La unión es un proceso rápido y el complejo colorante-proteína se mantiene estable hasta una hora después de producido.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, añadiendo 10 µl de muestra y de los patrones de proteínas (0,0312, 0,625, 0,125, 0,25 y 0,5 mg/ml de BSA) y 200 µl de reactivo de Bradford, preparado mezclando una parte del reactivo comercial concentrado con cuatro partes de agua MilliQ, y filtrando este a través de un filtro de 0,45 µm. Como blanco se usó tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Cada muestra se determinó por triplicado. La concentración de las proteínas presentes en la muestra se expresa en mg/ml.

### **3.9. Análisis estadístico.**

Se almacenaron los datos y se realizaron los cálculos con la ayuda del software Microsoft Excel (2007). Los datos de mortalidad se procesaron con ayuda del programa estadístico de Agencia Medio Ambiental de Estados Unidos (EPA-USA) para obtener por el método probit la  $LC_{50}$ .

Para comprobar la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos de colinesterasa, se realizó mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente con ayuda del programa estadístico IBM SPSS Statistics 22. A continuación una vez comprobadas ambos requisitos de normalidad y homogeneidad, usando el programa Microsoft Excel (2007) se realizó el test ANOVA (análisis de varianza) de un solo factor para ver si existían diferencias significativas entre los distintos tratamientos, si así resultaba se estudió con el test de comparaciones múltiples de Tukey. Un valor de  $p \leq 0,05$ , fue considerado estadísticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Examen previo de ingestión de microplástico.

Se realizó examen "de visu" al microscopio óptico. Se comparó con las imágenes del MP (Figura 4), donde se observan los MPs al microscopio a distintos aumentos y de las *A. salina* que habían permanecido en el blanco de agua mar en ambiente libre de MP (Figura 5), a distintos aumentos.

Se observaron imágenes compatibles con MP en el interior del sistema digestivo de los especímenes que estuvieron expuestos a concentraciones de 325 mg/l (Figura 6) y 26 mg/l (Figura 7). No obstante no se cuantificó ni se hicieron pruebas complementarias para caracterizar y confirmar la identidad de estos. No se detectaron en la concentración de 0,26 mg/l (Figura 8).

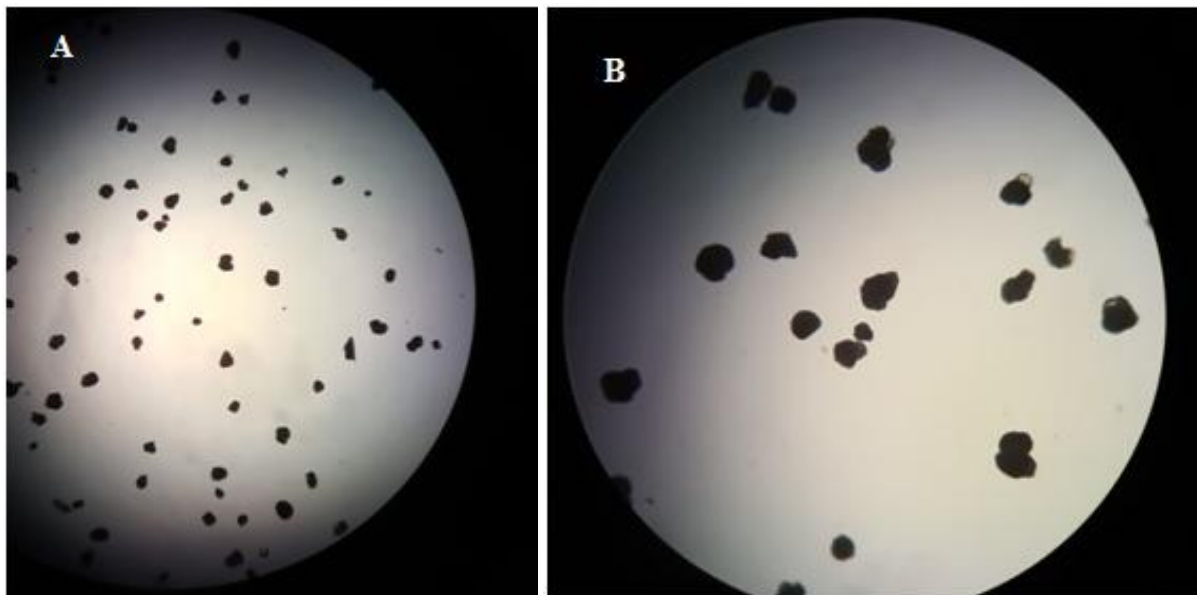


Figura 4. Imagen de MP al microscopio óptico. A: MP con un aumento total de 40 x, B:MP con un aumento total de 100 x.



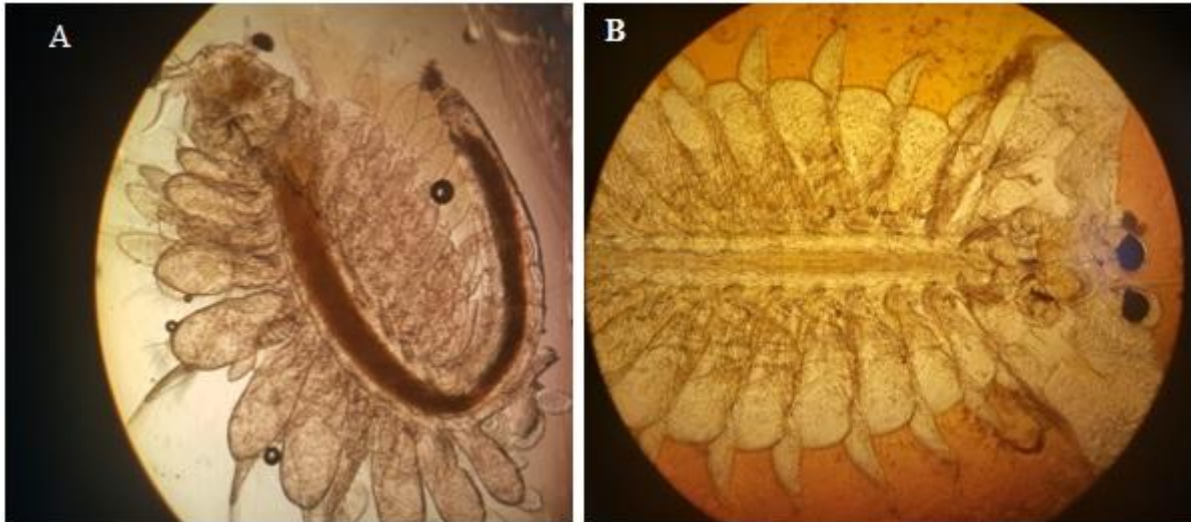


Figura 5. Imagen al microscopio óptico de *A. salina* expuesta 48 horas en agua de mar. A: Imagen al microscopio con un aumento total de 40 x, B: Imagen al microscopio con un aumento total de 100 x.

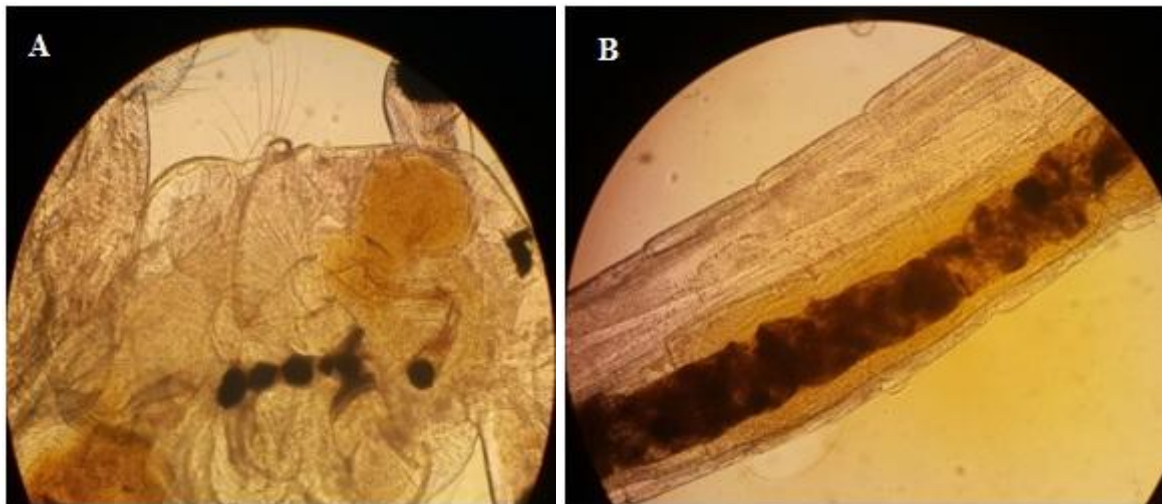


Figura 6. Imagen al microscopio óptico de *A. salina* expuesta 48 horas en medio con una concentración de 325 mg/l de MP en agua salina. A: Aumento total 100 x, B: Aumento total 100 x.

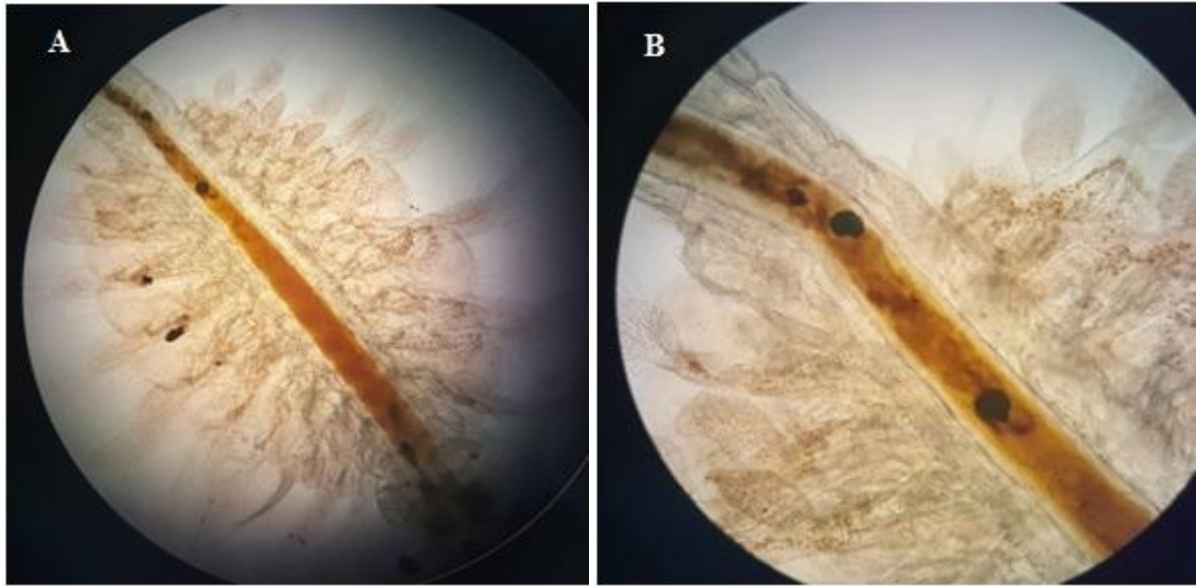


Figura 7. Imagen al microscopio óptico de *A. salina* expuesta 48 horas a una concentración 26 mg/l de MP en agua salina. A: Aumento total de 40 x, B: Aumento total de 100 x.



Figura 8. Imagen al microscopio óptico de *A. salina* expuesta 48 horas en un medio con concentración 0,26 mg/l de MP en agua salina. A: aumento total de 40 x, B: aumento total de 100 x.

#### **4.2. Examen de ingestión de MP en ensayo CPF+MP y TCS+MP.**

Aunque en el examen previo no se visualizó la ingestión de MP para la concentración de 0,26 mg/l. En el ensayo de CPF+MP se pudo visualizar en la réplica 1 del control de MP, que contenía únicamente 0,26 mg/l de MP en agua de mar, una imagen compatible con MP (Figura 9). No visualizándose en ninguna otra muestra de los ensayos.

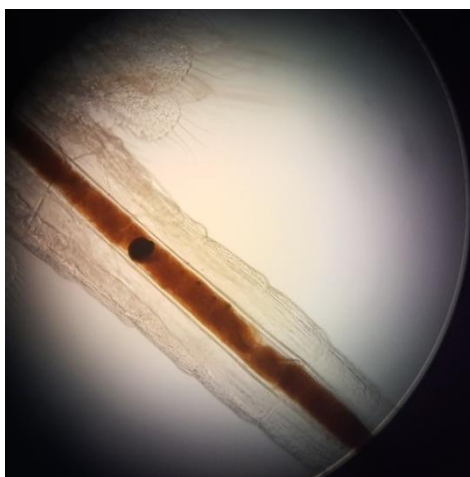


Figura 9. Imagen al microscopio óptico (aumento total 100 x) de *A. salina* expuesta 48 horas en un medio con concentración 0,26 mg/l de MP en agua de mar (control MP en ensayo CPF+MP).

#### **4.3. Tóxico de referencia. Determinación LC<sub>50</sub>.**

Los organismos expuestos al toxico de referencia, mostraron la mortalidad que se indica en la tabla 1.

A partir de los valores de mortalidad se calculó mediante el método probit, la LC<sub>50</sub> dando un valor de 24,41 mg/l y los límites de confianza 95% de (10,52-40,5 mg/l). El valor de la CL<sub>50</sub> del control positivo (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) en el bioensayo se encontró en el rango de los valores reportados (0,067-59,9 mg/l) para pruebas de toxicidad aguda en invertebrados acuáticos [29, 30]. Por lo que consideramos óptima la calidad de la población de crustáceos.

#### **4.4. Toxicidad de las sustancias objeto del ensayo. Determinación de LC<sub>50</sub>.**

Los organismos expuestos a CPF y CPF+MP durante 48 horas, mostraron la mortalidad que se indica en la tabla 2 y 3, en estas podemos observar al comparar los tratamientos de CPF con y si MP, que a las concentraciones más bajas (0,00195 y 0,0039 mg/l) el % de mortalidad es menor en el ensayo de CPF frente a CPF+MP, sin embargo al aumentar la concentración (0,0078 y 0,0156 mg/l) el patrón cambia, siendo la mortalidad

menor para el CPF+MP. A la concentración de 0,0312 mg/l se produjo el 100 % de mortalidad en ambos ensayos.

Los organismos expuestos TCS y TCS+MP durante 48 horas, mostraron la mortalidad que se indica en la tabla 4 y 5. En las tablas se puede apreciar que la mortalidad a 0,75 y 1,5 mg/l no difiere en el ensayo de TCS con y sin MP, al aumentar la concentración a 3 mg/l la mortalidad es menor en el ensayo donde se testa TCS solo y a 6 mg/l es el TCS + MP el que presenta menor mortalidad. A la concentración de 12 mg/l se produce el 100% de mortalidad en ambos ensayos. De forma general se observa que a las concentraciones más altas de tóxico la mortalidad es menor en los ensayos donde el toxico se encuentra asociado a microplástico.

Los test se consideraron validos ya que la mortalidad en los grupos control no excedió del 10%. Los valores de pH medidos en las soluciones al principio y final del ensayo se mantuvieron entre 7,66-7,69 unidades, el valor de oxígeno fue superior a 8 mg/l en las distintas soluciones medidas.

Con ayuda del programa estadístico de la EPA-USA mediante el ajuste de regresión Probit se calcularon los valores para la 48h-LC<sub>50</sub> con sus intervalos de confianza del 95% para *A. salina* adulta expuesta a los distintos tóxicos, resultando las cifras que se indican en la tabla 6. Los valores de LC<sub>50</sub> resultaron diferentes para el CPF, presentando un valor superior el CPF+MP con respecto a CPF. En el caso de TCS los valores fueron prácticamente iguales.

Tabla1. Mortalidad de *A. salina* expuesta al tóxico de referencia ( $K_2Cr_2O_7$ ) durante 24 horas.

$K_2Cr_2O_7$	Blanco		1,25 mg/l		2,5 mg/l		5 mg/l		10 mg/l		20 mg/l		40mg/l		80mg/l	
	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas
Replica 1	3	9	1	11	2	10	5	7	4	8	7	5	9	3	12	0
Replica 2	1	11	2	10	0	12	2	10	5	7	5	7	10	2	11	1
Replica 3	0	12	0	12	4	8	2	10	1	11	3	9	7	5	11	1
Media replicas	1	11	1	11	2	10	3	9	3	9	5	7	9	3	11	1
Mortalidad %	8,33		8,33		16,66		25,00		25,00		41,66		75,00		91,66	

Tabla 2. Ensayo toxicidad CPF. Mortalidad de *A. salina* expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.

CPF	Blanco		Blanco-Acetona		0,00195 mg/l		0,0039 mg/l		0,0078 mg/l		0,0156 mg/l		0,0312 mg/l	
	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas
Replica 1	1	9	2	8	1	9	1	9	1	9	10	0	10	0
Replica 2	1	9	1	9	2	8	3	7	5	5	10	0	10	0
Replica 3	2	8	1	9	1	9	3	7	6	4	10	0	10	0
Media replicas	1	9	1	9	1	9	2	8	7	3	10	0	10	0
Mortalidad %	10		10		10		20		70		100		100	

Tabla 3. Ensayo toxicidad CPF+MP. Mortalidad de *A. salina* expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.

CPF+ MP	Blanco		Blanco-Acetona		MP 0,26 mg/l		0,00195mg/l+ MP 0,26 mg/l		0,0039 mg/l+ MP 0,26 mg/l		0,0078 mg/l+ MP 0,26 mg/l		0,0156 mg/l+ MP 0,26 mg/l		0,0312 mg/l+ MP 0,26 mg/l	
	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas
Replica 1	1	9	2	8	1	9	2	8	4	6	3	7	7	3	10	0
Replica 2	1	9	1	9	2	8	5	5	1	9	5	5	9	1	10	0
Replica 3	2	8	1	9	1	9	5	5	5	5	7	3	6	4	10	0
Media replicas	1	9	1	9	1	9	4	6	3	7	5	5	7	3	10	0
Mortalidad %	10		10		10		40		30		50		70		100	

Tabla 4. Ensayo toxicidad TCS. Mortalidad de *A. salina* expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.

TCS	Blanco		Blanco-Acetona		0,75 mg/l		1,5 mg/l		3 mg/l		6 mg/l		12 mg/l		
	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	
Replica 1	1	9	0	10	10	2	8	1	9	1	9	7	3	10	0
Replica 2	2	8	1	9	9	2	8	0	10	2	8	6	4	10	0
Replica 3	0	10	1	9	9	0	10	3	7	2	8	9	1	10	0
Media replicas	1	9	1	9	9	1	9	1	9	2	8	7	3	10	0
Mortalidad %	10		10		10		10		20		70		100		

Tabla 5. Ensayo toxicidad TCS+MP. Mortalidad de *A. salina* expuesta a distintas concentraciones durante 48 horas.

TCS+MP	Blanco		Blanco-Acetona		MP 0,26 mg/l		0,75 mg/l+ MP 0,26 mg/l		1,5mg/l+ MP 0,26 mg/l		3 mg/l+ MP 0,26 mg/l		6mg/l+ MP 0,26 mg/l		12 mg/l+ MP 0,26 mg/l	
	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas
Replica 1	1	9	0	10	1	9	2	8	0	10	3	7	9	1	10	0
Replica 2	2	8	1	9	0	10	2	8	2	8	7	3	6	4	10	0
Replica 3	0	10	1	9	0	10	0	10	2	8	0	10	4	6	10	0
Media replicas	1	9	1	9	0	10	1	9	1	9	3	7	6	4	10	0
Mortalidad %	10		10		0		10		10		30		60		100	

Tabla 6. Valores de 48h-LC<sub>50</sub> e intervalos de confianza para *A. salina* adulta, expuesta a distintos tóxicos (CPF, CPF+MP, TCS, TCS+MP).

<b>Sustancia</b>	<b>48h-LC<sub>50</sub> (mg/l)</b>	<b>Intervalos de confianza 95% (mg/l)</b>
<b>CPF</b>	0,006	(0,002-0,009)
<b>CPF+MP</b>	0,012	(0,001-0,018)
<b>TCS</b>	4,979	(2,096-6,872)
<b>TCS+MP</b>	4,957	(2,431-7,093)

#### **4.5. Determinación colinesterasa.**

Tras el cálculo de la actividad enzimática y las proteínas se procedió a la obtención de la actividad específica del enzima colinesterasa, expresada como nmol/min mg proteínas. Los valores resultantes se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media, en la tabla 7 para el CPF y CPF+MP y en la Tabla 8 para TCS y TCS+MP.

En algunas concentraciones no se pudo determinar ya que todas los especímenes habían muerto, en otras concentraciones solo se disponían de dos replicas o una, resultando en algún caso insuficiente.



Tabla 7. Actividad específica colinesterasa de *A. salina* tras el ensayo de exposición a CPF y CPF+MP durante 48 h. Los resultados son expresados como medias  $\pm$  errores estándar. Siendo n el número de muestras. - No sobrevivió ningún espécimen.

<b>Actividad específica colinesterasa(nmol/min mg)</b>		
		<b><math>\pm</math>error estándar de la media</b>
Blanco		<b>14,69 <math>\pm</math> 0,98 (n=3)</b>
Blanco-Acetona		<b>13,18 <math>\pm</math> 0,69 (n=3)</b>
MP (0,26 mg/l)		<b>8,64 <math>\pm</math> 0,38 (n=2)</b>
<b>CPF</b>	<b>CPF+MP</b>	
0,00195 mg/l		<b>12,65 <math>\pm</math> 0,77 (n=3)</b>
0,0039 mg/l		<b>7,75 <math>\pm</math> 1,09 (n=3)</b>
0,0078 mg/l		<b>12,72 <math>\pm</math> 1,22 (n=2)</b>
0,0156 mg/l		-
0,0312 mg/l		-
	0,00195 mg/l + 0,26 mg/l	<b>10,62 <math>\pm</math> 1,16 (n=3)</b>
	0,0039mg/l + 0,26 mg/l	<b>9,07 <math>\pm</math> 0,65 (n=2)</b>
	0,0078 mg/l + 0,26 mg/l	<b>5,99 <math>\pm</math> 0,92 (n=3)</b>
	0,0156 mg/l + 0,26 mg/l	<b>No suficiente muestra</b>
	0,0312 mg/l + 0,26 mg/l	-

Tras aplicar ANOVA de un solo factor y observar que había diferencias entre las distintas concentraciones, se utilizó el test de Tukey para distinguir estas. El valor de la concentración de 0,0078 mg/l se considero anormalmente elevado (podría ser debido a un error en el proceso analítico), por lo que no se tuvo en cuenta dicho resultado.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el MP con el blanco de agua de mar, entre la concentración 0,0039 mg/l y la concentración 0,0078 mg/l+0,26mg/l con los blancos de agua de mar y el BA, además de entre 0,00195 mg/l con la concentración de 0,0039 mg/l y 0,0078 mg/l + 0,26 mg/l. Y de 0,00195 mg/l + 0,26 mg/l con 0,0078 mg/l + 0,26 mg/l.

No se observaron diferencias entre iguales concentraciones de 0,0019 y 0,0039 mg/l de CPF con y sin MP.

Tabla 8. Actividad específica colinesterasa de *A. salina* en ensayo de exposición a TCS y TCS+MP durante 48 h. Los resultados son expresados como medias  $\pm$  errores estándar. Siendo n el número de muestras. - No sobrevivió ningún espécimen.

<b>Actividad específica colinesterasa (nmol/min mg)</b>		
<b><math>\pm</math>error estándar de la media</b>		
Blanco		<b>9,81 <math>\pm</math> 0,71 (n=3)</b>
Blanco-Acetona		<b>10,08 <math>\pm</math> 0,96 (n=3)</b>
MP (0,26 mg/l)		<b>10,19 <math>\pm</math> 2,37 (n=3)</b>
<b>TCS</b>	<b>TCS + MP</b>	
0,75 mg/l		<b>6,68 <math>\pm</math> 0,73 (n=3)</b>
1,5 mg/l		<b>8,87 <math>\pm</math> 0,45 (n=2)</b>
3 mg/l		<b>6,61 <math>\pm</math> 0,78 (n=3)</b>
6 mg/l		<b>10,43 <math>\pm</math> 0,55 (n=2)</b>
12 mg/l		-
	0,75 mg/l + 0,26 mg/l	<b>7,18 <math>\pm</math> 2,46 (n=3)</b>
	1,5 mg/l + 0,26 mg/l	<b>9,23 <math>\pm</math> 1,42 (n=3)</b>
	3 mg/l + 0,26 mg/l	<b>11,26 <math>\pm</math> 1,94 (n=2)</b>
	6 mg/l + 0,26 mg/l	<b>8,63 <math>\pm</math> 4,50 (n=2)</b>
	12 mg/l + 0,26 mg/l	-

Tras aplicar ANOVA de un solo factor no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones del ensayo de TCS y TCS+MP.

## 5. DISCUSION

Los resultados del estudio de CPF y TCS sobre *A. salina* indican importante toxicidad de ambos, siendo esta mayor para CPF. La asociación de estos tóxicos con el MP (cloruro de polivinilo) no aumentó la toxicidad de estos.

Confrontando los valores obtenidos de  $LC_{50}$ , se observó que la preparación más tóxica correspondía al CPF, seguida de la de CPF+MP y por último las de TCS+MP y TCS, que eran prácticamente iguales.

Son muchos los estudios que han testado CPF y TCS frente a distintos organismos acuáticos, sin embargo existen pocos de cómo puede verse afectada la toxicidad si se asocian con MP.

Si comparamos el valor de 48h- $LC_{50}$  para TCS (4,979 mg/l) obtenido en nuestro estudio, este fue superior a los encontrados en la literatura, así en el trabajo de Xiaolu y col. [31] estos reportan en su estudio de toxicidad de TCS sobre *A. salina* (nauplio) un resultado para la 24h- $LC_{50}$  de 0,171 mg/l.

El trabajo de Iannacone y col. [32] que estudia la toxicidad de antimicrobianos sobre *Artemia franciscana* (nauplios fase II) aporta un valor 48h- $LC_{50}$  de 0,72 mg/l.

El estudio en otro género de crustáceos de Perron y col. [33] que estudian el efecto de TCS frente a los invertebrados *Ampelisca abdita* y *Americamysis bahia* (ejemplares de 48 horas de vida) da una 48h- $LC_{50}$  de 0,0913 mg/l y 0,0956 mg/l respectivamente.

En otros organismos acuáticos, en el artículo de Oliveira y col. [34] sobre efecto del TCS en el pez cebra (*Danio rerio*) para embriones/larvas resultan valores 96h- $LC_{50}$  de 0,42 mg/l y para adultos la 96h- $LC_{50}$  fue de 0,34 mg/l. En este trabajo también examinaron la variación en los valores de biomarcadores, entre ellos la Colinesterasa, no observando disminución en los niveles, al igual que ocurre en nuestro caso donde no se observan diferencias entre las distintas concentraciones ensayadas y el blanco.

Reiterar que el valor de  $LC_{50}$  para el TCS en nuestro trabajo es superior al encontrado por otros autores en la misma y distinta especie. La diferencia podría ser debido a la fase de desarrollo del bioindicador, que en nuestro caso se trata de formas adultas.

En cuanto a la  $LC_{50}$  de la asociación del TCS+MP, no se observó diferencia con la  $LC_{50}$  de TCS, dando un valor prácticamente igual.

Sybeg y col. [35] ensayaron con la especie *Acartia tonsa* (adulto) exponiéndola a TCS solo y en presencia del MP polietileno (500 MP/ml), resultando una 48h- $LC_{50}$  para TCS de

0,1579 mg/l y la de TCS+MP de 0,1096 mg/l, con estos datos concluyen los autores que la mezcla del MP+TCS es más tóxica que el TCS solo.

Con la salvedad de que la especie de crustáceo marino y el MP fueron diferentes, estos datos discrepan con los observados por nosotros, donde no se observó diferencia entre las LC<sub>50</sub> del TCS y TCS+MP.

Por otro lado, el ensayo para CPF arrojó un valor 48h-LC<sub>50</sub> para *A. salina* de 0,006 mg/l y de 0,012 mg/l para CPF+MP, estos valores se encuentran en el rango de los encontrados por otros autores en las formas adultas y juveniles de organismos acuáticos como se muestra a continuación.

Osuna y col. [36] evaluaron la toxicidad al CPF en crustáceos del género *Panaeus sp* (juveniles), presentando una 48h-LC<sub>50</sub> de 0,00207 mg/l.

Estudios previos de otros autores como el de Galindo y col. [37] indican una 48h-LC<sub>50</sub> de 0,0048 mg/l en el ensayo con el crustáceo *Panaeus vannamei* (juveniles) expuesto a CPF.

Varó y colaboradores en el trabajo [38] donde evalúan la toxicidad de CPF sobre nauplios de distintas especies del genero *Artemia sp.*, comprueban diferencias en la sensibilidad al tóxico, indicando que la especie más sensible es *Artemia salina* con valores de 24h-LC<sub>50</sub> que van de 0,95 mg/l a 5,12 mg/l. Describiendo también que las diferencias no solo se encuentran dependiendo de la especie ensayada (*A. salina*, *A. persimilis*, *A. franciscana* y *A. parthenogenetica*), sino también entre cepas de la misma especie.

Estos últimos autores en un ensayo posterior [19], evaluaron la toxicidad de CPF en *Artemia parthenogenetica* y en peces adultos *Gambusia affinis* y *Aphanius iberus*, observaron mayor resistencia a CPF del genero *Artemia* comparada con las dos especies de peces (48h-LC<sub>50</sub> para *G. affinis* de 0,5 mg/l y 48h-LC<sub>50</sub> para *A. iberus* de 0,0386 mg/l), además dentro del género *Artemia* existía distinta sensibilidad al tóxico según el grado de desarrollo, presentando los nauplios una 24h-LC<sub>50</sub> mayor de 18 mg/l, las formas juveniles de 3,9 (±0,9) mg/l y formas adultas de 0,08 ±(0,01) mg/l.

Otro trabajo [39] que evalúa el efecto del CPF entre otros biocidas, sobre *A. salina* (nauplio), indica una 24h-LC<sub>50</sub> de 2,032 con un intervalo 95% de confianza (0,416-6,891mg/l), que se encuentran en el rango de los encontrados por el trabajo citado anteriormente [38] que da unos valores medios de 24h-LC<sub>50</sub> para distintas cepas *A. salina* de 0,95, 1,86, 3,19 y 5,12 mg/l. En este mismo estudio estudian la actividad de la acetilcolinesterasa, con nauplios recién nacidos frente a nauplios de 48 horas de vida, observando que los primeros presentaban mayor disminución de actividad colinesterasa que

los de 48 horas de edad cuando se exponen a la presencia de CPF durante 24 horas, describiéndolo como un marcador muy útil para predecir señales de contaminación por este tóxico en el agua.

Con los datos de estos estudios sobre CPF, se observa que existe diferencia en la sensibilidad no solo entre especies sino también dependiendo de la fase de desarrollo. Las formas adultas y juveniles parecen más sensibles que la forma nauplio, así resulta de gran importancia en los experimentos la elección del bioindicador y la fase de desarrollo para tratar de elegir la más sensible y así tener un mayor rango de seguridad. Nuestros datos de LC<sub>50</sub> están más en concordancia con los valores aportados por los autores que trabajan con formas adultas y juveniles.

En cuanto a la asociación del CPF con MP, no se observa que el MP aumente la toxicidad de CPF, todo lo contrario, el valor de LC<sub>50</sub> se duplica. Aunque no en el mismo espécimen acuático, este efecto reductor de la toxicidad ha sido mencionado por otros autores [40] que indican que la adsorción del CPF al MP reduce la toxicidad en test realizados sobre crecimiento de algas (*Isochrysis galbana*).

En cuanto a la actividad colinesterasa, si observamos los datos obtenidos por otros autores, Oliveira y col. [41] demostraron que la exposición a MP (polietileno) solo en un ensayo de 96 horas, con concentraciones de 18,4 µg/l y 184 µg/l reducía la actividad de acetilcolinesterasa en muestras del pez *Pomatoschistus microps*. Luis y col. [15] encontraron similares resultados que en el estudio anterior, la exposición a MP (polietileno), reducía aproximadamente un 20% la actividad colinesterasa en un ensayo realizado con juveniles de *P. microps* expuestos 96 h.

Con los datos de nuestro estudio no podemos llegar a ninguna conclusión, con respecto a la disminución de la actividad colinesterasa producida por MP, si bien en el ensayo del CPF+MP, cuando se prueba MP solo en el control, existe una reducción significativa con respecto al blanco de agua de mar. En el ensayo de TCS+MP encontramos que al testar en la misma concentración el MP presenta prácticamente el mismo valor que el blanco.

La actividad colinesterasa en el ensayo de TCS no se va a ver disminuida en los distintos tratamientos, como también ha sido descrito por otros investigadores que han trabajado con peces [34, 42].

Las sustancias organofosforadas (CPF) se conocen como prototipos de inhibidores de esta enzima. En el test, de forma general la actividad específica de la colinesterasa fue disminuyendo a medida que aumentaban las concentraciones ensayadas de CPF. No

existiendo diferencias estadísticamente significativas en dicha actividad colinesterasa, entre iguales concentraciones de CPF con y sin MP.

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se llegó a partir de los resultados obtenidos han sido:

\* En las condiciones del ensayo el MP no aumentó la toxicidad de TCS y CPF cuando se mezcló con estos, incluso en el caso de CPF disminuyó esta, quizás la adsorción al MP haga menos disponible el tóxico al bioindicador.

\* Solo observamos una ingestión de los microplásticos por parte del bioindicador *A. salina* si la concentración era alta o muy alta.

\* No se observó una disminución de la actividad colinesterasa en el test con TCS y TCS+MP. Se produjo disminución de la actividad colinesterasa en el ensayo con CPF y CPF+MP, no observando diferencias estadísticamente significativas entre iguales concentraciones de CPF solo o asociado a microplástico.

\* Es muy importante en bioensayos elegir los organismos más sensibles con objeto de tener un mayor grado de seguridad, no solo es importante la especie sino también la fase de desarrollo. En nuestro trabajo comprobamos la importancia de la fase de desarrollo, según la sustancia a testar el comportamiento era diferente, la forma adulta de *A. salina* resulta ser más resistente al TCS que los datos publicados para nauplios. Sin embargo, en el caso del CPF era lo contrario, la forma adulta resultó tener una sensibilidad mayor que los datos publicados para nauplios, esto último en concordancia con lo publicado por Varó y colaboradores [19].

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] National Center for Biotechnology Information. Pub Chem Compound Database; CID=2730. Disponible en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2730> (Consultado 27 Agosto de 2018).
- [2] Vale JA. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol lett.* 1998; 102:649-652.
- [3] Cocca C, Ventura C, Nunez M, Randi A, Venturino A. El organofosforado clorpirifós como disruptor estrogénico y factor de riesgo para el cáncer de mama. *Acta toxicol. argent.* 2015; 23(3):142-152.
- [4] Salud, seguridad y medio ambiente en la industria. Disponible en <https://www.estrucplan.com.ar/producciones/imprimir.asp?IdEntrega=1085>. (consultado 27 Agosto 2018)
- [5] National Center for Biotechnology Information. Pub Chem Compound Database; CID=5564, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564> (Consultado 27 Agosto 2018).
- [6] McAvoy DC, Schatowitz B, Jacob M, Hauk A, Eckhoff WS. Measurement of triclosán in wastewater treatment systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002; 21(7):1323-9.
- [7] Perron MM, Ho KT, Cantwell MG, Burgess RM, Pelleterier MC. Effects of triclosan on marine benthic and epibenthic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012; 31(8):1861-1866.
- [8] Ishibashi H, Matsumura N, Hirano M, Matsuoka M, Shiratsuchi H, Ishibashi Y. et al. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat. Toxicol.* 2007; 67:167-179.
- [9] Levy CW, Roujeinikova A, Sedelnikova S, Baker PJ, Stuitje AR, Slabas AR. et al. Molecular basis of triclosán activity. *Nature.* 1999; 398:383-384.
- [10] Plastics Europe, 2017. Plastic – The Facts 2017. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Disponible en <https://www.plasticseurope.org/es/about-plastics>. (consultado 10 Agosto 2018).
- [11] Andrady AL. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 2011; 62: 1596–1605.
- [12] Sanchez W, Bender C, Porcher JM. Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: Preliminary study and first evidence. *Environ. Res.* 2014; 128:98–100.
- [13] Costa MF, Ivar do Sul JA, Silva-Cavalcanti JS, Araújo MC, Spengler A, Tourinho PS. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. *Environ Monit Assess.* 2010; 168:299-304.



- [14] Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP). (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. Exeter, UK: Polestar Wheatons. Editor: Kershaw, P. RepStud GESAMP. 90.
- [15] Luís LG, Ferreira P, Fontea E, Oliveira M, Guilhermino L. Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium (VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. *Aquatic Toxicology*. 2015; 164:163–174.
- [16] Antao Barboza LG, Russo Vieira L, Guilhermino L. Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Changes in behavioral responses and reduction of swimming velocity and resistance time. *Environ. Pollut.* 2018; 236: 1014-1019.
- [17] Varó I, Serrano R, Pitarch E, Amat F, López FJ, Navarro JC. Bioaccumulation of Chlorpyrifos Through an Experimental Food Chain: Study of Protein HSP70 as Biomarker of Sublethal Stress in Fish. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2002; 42: 229–235.
- [18] Hutchinson TH, Solbe J, Kloepper-Sams PJ. Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database. III- Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*. 1998; 36(1):129-142.
- [19] Varó I, Serrano R, Pitarch E, Amat F, López FJ, Navarro JC. Toxicity and Bioconcentration of Chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). *Bull Environ Contam Toxicol*. 2000; 65:623-630.
- [20] Dumitrascu M. *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*. 2011; 2(4):119-122.
- [21] FAO. Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB474S/AB474S00.htm> (consultado 27 Agosto 2018)
- [22] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS 202. "Daphnia sp., Acute Immobilisation Test. 13 April 2004.
- [23] Albendín G, Arellano JM, Manuel-Vez MP, Sarasquete C, Arufe MI. Characterization and in vitro sensitivity of cholinesterases of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to organophosphate pesticides. *Fish Physiol. Biochem*. 2017; 43:455–464.
- [24] Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CM, Pinho GL, et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol. Toxicol*. 2007; 146:221-234.

- [25] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Freatherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7:88-90.
- [26] Guilhermino L, Lopes MC, Carvalho AP, Soares AM. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 1996; 32:727-738.
- [27] Varó I, Redón S, García-Roger EM, Amat F, Guinot D, Serrano R, Navarro JC. Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*. *Aquatic Toxicology.* 2015; 161:208–220.
- [28] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- [29] United Nation Environment Programme (UNEP), International Labour Organization (ILO), World Health Organization (WHO). 1988. International Programme of Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria (EHC) 61, Chromium.
- [30] González Y, Apórtela P. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología.* 2001;1:104-108.
- [31] Xiaolu X, Yin L, Deyong Z, Yinyin W, Xianshan Z, Huiying X, Yu M. Toxic Assessment of Triclosan and Triclocarban on *Artemia salina*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2015; 95:728–733.
- [32] Iannacone JJ, Alvariño L, Valle Riestra V, Ymaña B, Argota G, Fimia F, Carhuapoma M, Castañeda L. Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). *Revista Toxicología.* 2016; 33:31-38.
- [33] Perron MM, Ho KT, Cantwell MG, Burgess RM, Pelletier MC. Effects of triclosan on marine benthic and epibenthic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012; 31(8):1861-1866.
- [34] Oliveira R, Domingues I, Koppe Grisolia C, Soares AM. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2009; 16:679-688.
- [35] Syberg K, Nielsen A, Khan FR, Banta GT, Palmqvist A, Jepsen PM. Microplastic potentiates triclosan toxicity to the marine copepod *Acartia tonsa*. *J Toxicol Environ Health A.* 2017; 80:23-24.
- [36] Osuna I, López D, Galindo JG, Riva MC. Evaluacion toxicologica de metilparatión,

metilazinfós, clorpirifós, diazinón y metamidofos en camarones del género *Penaeus* sp. Boletín Intexter (Universidad Politécnica de Cataluña). 1997; 111:65-71.

[37] Galindo RJ, Medina JA, Villagrana LC. Toxic effects of organochlorine pesticides on *Penaeus vannamei* shrimps in Sinaloa, México. *Chemosphere*. 1996; 33(3): 567-575.

[38] Varó I, Serrano R, Navarro JC, Lopez FJ, Amat F. Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide Chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998; 61:778-785.

[39] Baek I, Choi HJ, Rhee JS. Inhibitory effects of biocides on hatching and acetylcholinesterase activity in the brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicol Environ Health Sci*. 2015; 7:303-308.

[40] Garrido S, Linares M, Campillo JA, Albentosa M. Effect of microplastics on the toxicity of chlorpyrifos to the microalgae *Isochrysis galbana*, clone T-ISO. En: Cobelo A, Nieto O, Viñas L, Álvarez-Salgado XA, Editors. XIX Seminario Ibérico de Química Marina; 2018 Junio 20-22; España. Vigo; 2018.p. 55.

[41] Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K, Guilhermino L. Single and combined effects of microplastic and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps*. *Ecol Indic*. 2013; 34:641-647.

[42] Albendín G, Cabrera-Pozo I, Coello D, Rodríguez-Barroso R, Quiroga JM, Arellano JM. Effects of triclosan and its mixed with microplastics on acetylcholinesterase present on head of *Solea senegalensis*. En: Cobelo A, Nieto O, Viñas L, Álvarez-Salgado XA, Editors. XIX Seminario Ibérico de Química Marina; 2018 Junio 20-22; España. Vigo; 2018.p. 97-98.