



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudio de la ingesta de microplásticos en doradas expuestas a una dieta enriquecida con plásticos

María Micaela Julià Smit

Grau de Biologia

Any acadèmic 2018-2019

Treball tutelat per Salud Deudero Company.

Centro Oceanográfico de Baleares (COB) – Instituto Español de Oceanografía (IEO).

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Microplásticos, estrés oxidativo, biomarcadores, *Sparus aurata*.

Resumen

En la actualidad, la contaminación de los plásticos continúa siendo una fuente de preocupación importante entre la comunidad científica y el público. Concretamente, las Islas Baleares presentan una gran riqueza de especies marinas y es considerado como un ecosistema sensible que se expone a una gran variedad de amenazas de origen antropogénico. Destacando, el incremento de los residuos plásticos marinos. A pesar de que existe evidencia científica sobre la interacción de los peces con los microplásticos, el impacto que estos pueden generar a través de la ingesta, la interacción con los contaminantes ambientales o la bioacumulación en los organismos continúan siendo objeto de investigación. Por lo que este trabajo tiene como objetivos: (1) valorar los efectos de activación de especies enzimáticas derivados de la exposición a diferentes tipos de dietas enriquecidas con microplásticos en doradas (*Sparus aurata*) durante un periodo de 90 días a partir de muestras de tejido hepático; (2) comparar los resultados obtenidos para las respuestas de los biomarcadores de estrés oxidativo para los diferentes tipos de dietas; (3) revisión de la literatura existente sobre el impacto de la ingesta de microplásticos en especies de peces y el uso de biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores del impacto de los microplásticos y contaminantes del ambiente marino.

Abstract

Currently, plastic contamination continues to be a major source of concern between the scientific community and the public. Specifically, the Balearic Islands present a great wealth of marine species and is considered as a sensitive ecosystem that is exposed to a variety of threats with anthropogenic origin. Among which; the increase in marine plastic waste stands out. Despite the scientific evidence on the interactions of fish with microplastics; the impact that these can generate through intake, the interaction of these plastic particles with environmental pollutants or bioaccumulation in organisms continue to be the subject of research. Therefore, the objectives of this work are: (1) assess the effects of activation of enzymatic species derived from exposure to different types of diets enriched with microplastics in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during 90 days from samples of liver tissue; (2) compare the results obtained for the responses of the oxidative stress biomarkers for the different types of diets; (3) review of the existing literature on the impact of the intake of microplastics in fish species and the use of biomarkers of oxidative stress as indicators of the impact of microplastics and pollutants in the marine environment.

Índice general

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 Microplásticos: Clasificación, distribución en el ambiente, y composición.....	7
2.2 Interacción de los microplásticos con los contaminantes del ambiente.....	11
2.3 Daños fisiológicos derivados de la ingesta de microplásticos.....	13
2.4 El estrés oxidativo derivado de la ingesta de microplásticos	15
2.5 Biología de <i>Sparus aurata</i>	18
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Área de estudio.....	19
4.2 Tratamientos.....	19
4.3 Programación	20
4.4 Muestreo	20
4.5 Aspectos éticos.....	21
4.6 Control de calidad	21
4.7 Procesamiento de las muestras para la actividad enzimática (ROS).....	21
4.8 Análisis de los datos	22
5. RESULTADOS.....	22
6. DISCUSIÓN	25
7. OBSERVACIONES FINALES	28
8. AGRADECIMIENTOS	28
9. REFERENCIAS.....	28

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA (EN INGLÉS)	DEFINICIÓN
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
DDTs	Dicloro-difenil tricloro etano
FLU	Fluorantreno
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Forma reducida del glutatión
GSSG	Forma oxidada del glutatión
GST	Glutación S-transferasa
HDPE	Polietileno de elevada densidad
LDPE	Polietileno de baja densidad
MDA	Malondialdehído
MMT	Millones de Toneladas Métricas
MPs	Microplásticos
P	Fenantreno
PAHs	Hidrocarburos Policíclicos aromáticos
PBDEs	Éteres de Polibromodifenilos
PBTs	Sustancias Persistentes Bioacumulativas y Tóxicas
PCBs	Policlorobifenilos
PE	Polietileno
POPs	Contaminantes orgánicos persistentes
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVCs	Cloruro de Polivinilo
PY	Pireno
REDOX	Reacciones de oxidación-reducción
ROS	Especies de oxígeno reactivas
SOD	Superóxido dismutasa

1. INTRODUCCIÓN

Por más de tres décadas, la contaminación de los plásticos ha sido una fuente de preocupación entre la comunidad científica y el público (Prokić *et al.*, 2019). Dado que los beneficios de los plásticos, incluida su durabilidad y resistencia a la degradación, resultan inversamente en impactos ambientales negativos. Esto es debido a la creciente dependencia de los plásticos como un elemento cotidiano, el rápido aumento en su producción y eliminación posterior (Lusher, 2015).

Según los últimos datos recolectados por PEMRG (Plastics Europe Market Research Group) y Conversio Market & Strategy GmbH, la producción mundial de plástico alcanzó 350 millones de toneladas en 2018. De las cuales, 64.4 millones de toneladas solo en Europa (Plastics Europe Facts 2018). Sin embargo, China continúa siendo el mayor productor de material plástico (50.1%), seguido por Europa (18.5%), América del Norte (17.7%), África del Oriente Medio (7.1%) y América latina (4%) (Prokić *et al.*, 2019; PlasticsEurope Facts 2018). Y se predice que alcance los 2.2 billones de toneladas anuales para el año 2025 (Rochman *et al.*, 2013). Por lo que no es desacertado afirmar que estamos viviendo en la era del plástico.

Asimismo, de un total de 192 países con zonas costeras, 20 países son responsables de más del 80% de los fragmentos de plástico que terminan en los océanos del mundo. Estos 192 países producen 275 millones de toneladas métricas (MMT) de deshecho plástico cada año, y de esta cantidad, se estima que acerca de 4.8-12.7 MMT de residuos plásticos mal-administrados entraron en el océano en 2010. De los 20 países mencionados anteriormente, 16 son países de ingresos bajos a medio altos, en los que se está produciendo un rápido crecimiento económico, a pesar de la falta de infraestructura de gestión de residuos, lo que favorece la acumulación y dispersión de los plásticos generados (Prokić *et al.*, 2019).

Concretamente en España, se generaron 1.608.873 toneladas de residuos de envases plásticos, de los cuales sólo se reciclaron el 47.94% (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2016). Esto es debido a que la mayor parte del plástico se descarta como basura (tras un año de producción), siendo las principales fuentes terrestres los vertidos ilegales (residuos plásticos mal-administrados) además de la inadecuada gestión de los mismos. Estos desechos plásticos son materiales que están sucios y se depositan de forma inadecuada (Prokić *et al.*, 2019). Por lo que hoy en día, se encuentran como contaminantes en todos los hábitats, desde los polos hasta el Ecuador.

De hecho, las tendencias globales, sugieren que la acumulación se está incrementando en los ambientes acuáticos, en consonancia con las tendencias en la producción de plásticos que se han multiplicado por 560 en poco más de 60 años (Rochman *et al.*, 2014). Por lo que los residuos plásticos llegan al mar a través de ríos y cursos de agua, como consecuencia de su expulsión terrestre o como resultado de los artículos que se desechan directamente al mar. Sin embargo, es difícil de determinar con exactitud cuanto plástico se encuentra presente en los hábitats marinos, pero se ha sugerido que hasta el 10% de todos los desechos plásticos acaba en el mar (Thompson, 2007).

En concreto, la cuenca Mediterránea es un punto de acceso para la diversidad marina y se considera un ecosistema sensible que se expone a especies invasoras, artes de pesca, actividades turísticas, rutas marítimas y áreas costeras urbanizadas que incrementan los residuos marinos (Alomar *et al.*, 2017). De hecho, las Islas Baleares, localizadas en el Mediterráneo occidental están expuestas a un estrés antropogénico que produce un impacto en los hábitats costeros. Entre dichas actividades comerciales y recreativas, se incluyen rutas de navegación, las cuales se incrementan durante el verano, así como una densa población y urbanización a lo largo de la costa que, directa o indirectamente, impactan el medio marino (Alomar, Estarellas & Deudero; 2016).

De hecho, los hábitats del fondo marino son considerados como el sumidero final para los plásticos en el ambiente marino (Alomar *et al.*, 2017). Y la ingesta de microplásticos en especies marinas, puede aportar indirectamente información sobre la acumulación de microplásticos (MPs) en el ambiente. Por lo que, las concentraciones elevadas y predecibles de MPs en la cuenca Mediterránea avisan del potencial riesgo tanto fisiológico como ecológico que estas partículas artificiales suponen para los organismos marinos en esta región (Alomar *et al.*, 2017).

Por esta razón, en los últimos años, el número de estudios sobre los MPs se han incrementado. Aun así, muchos de estos estudios se han centrado en la aparición y distribución de los MPs en el ambiente (Karami *et al.*, 2016). Y a pesar de que existe una investigación emergente en lo que se refiere a la ingesta de macro y MPs, el conocimiento de los efectos fisiológicos causados por el consumo directo de los MPs en peces es limitado (Alomar *et al.*, 2017).

En definitiva, la evidencia existente de que los MPs son ingeridos por las especies de peces, así como los efectos fisiológicos derivados de la ingesta de sustancias exógenas como los MPs son una realidad que necesita ser investigada (Alomar *et al.*, 2017; Alomar and Deudero; 2017).

2.1 Microplásticos: Clasificación, distribución en el ambiente y composición

Existe un interés incipiente por la contaminación de los MPs, dado que estos pequeños residuos de plástico definidos como “cualquier plástico con un tamaño inferior a 5 mm” (Andrady; 2011; Compa & Deudero; 2018; Pedà *et al.*, 2016), son muy difíciles de recoger y de eliminar del ambiente, debido a su tamaño. En el año 2011, Andrady propuso un nuevo término, “mesoplásticos” (5-25 mm) para distinguir los fragmentos de menor tamaño visibles para el ojo humano de aquellos que eran visibles bajo el microscopio.

De hecho, los pequeños plásticos se pueden distinguir en: MPs (< 5mm) y nanoplásticos (< 100 nm). Estos últimos, se consideran potencialmente mucho más peligrosos que los MPs de mayor tamaño, ya que pueden penetrar más fácilmente en las células y las membranas de los orgánulos reteniendo otros productos químicos tóxicos. Sin embargo, existen pocos datos disponibles con respecto a los nanoplásticos, por lo que es necesario llevar a cabo futuras investigaciones en este área para poder dilucidar los mecanismos de acción y las consecuencias toxicológicas de los nanoplásticos (Prokić *et al.*, 2019).

En primer lugar, los MPs son productos de polímeros sintéticos como; cosméticos exfoliantes, o partículas derivadas de la fragmentación de residuos plásticos de gran tamaño como las fibras de poliéster, las bolsas de plástico y partículas de poliestireno (PS) (Pedà *et al.*, 2016). Son contaminantes ubicuos que se encuentran en todos los componentes incluyendo el agua, los sedimentos y la biota del ambiente marino (Magara *et al.*, 2018).

Los MPs se pueden clasificar principalmente en MPs primarios y secundarios. Los MPs primarios, son producidos de forma intencionada a escala microscópica con el fin de adoptar cierto tamaño. Esta categoría incluye la producción de los conocidos “pellets” o polvo, además de microesferas de plástico. Las cuales son usadas en formulaciones cosméticas, productos de limpieza y abrasivos industriales (Alomar *et al.*, 2017). Además, dichas perlas de plástico primario son comúnmente utilizadas en la investigación debido a que son plásticos homogéneos, en lo que respecta al tamaño y composición; características que los plásticos secundarios derivados del ambiente no poseen (Megara *et al.*, 2018).

Mientras que los MPs secundarios resultan de la conversión de los plásticos de mayor tamaño conocidos como macroplásticos (>25 mm) (Andrady, 2011; Compa & Deudero, 2018) en pequeñas piezas, debido a los procesos autocatalíticos, termooxidativos, fotooxidativos, y a la degradación biológica (Alomar *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2016).

Por lo que los materiales plásticos entran en el ambiente directamente como materiales de producción primaria (como, por ejemplo, las pinturas de agua, aplicaciones médicas, electrónica, revestimientos y adhesivos), o como materiales secundarios tras la fragmentación de desechos plásticos de mayor tamaño a través de los procesos de hidrólisis o biodegradación entre otros (Prokić *et al.*, 2019).

En la *Figura 1*, se muestra los lanzamientos globales de MPs primarios a los océanos del mundo, donde es particularmente notable que la abrasión de los neumáticos (28%), el lavado de la ropa (35%) y el polvo de la ciudad en conjunto (25%), representan el 87%.

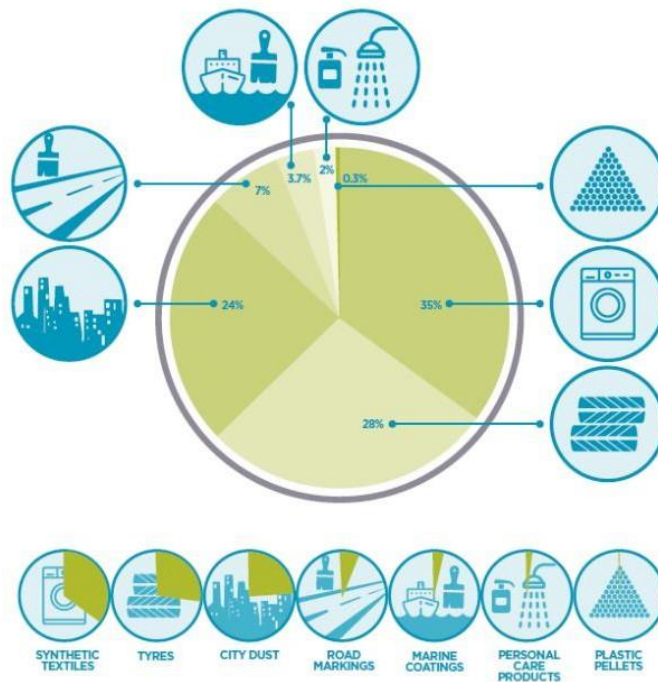


Figura 1. Lanzamientos globales de MPs primarios a los océanos del mundo (European Commission's, Scientific Advice Mechanism (SAM) (Boucher *et al.*, 2017). El estudio denominado como Eunomia (Hann *et al.*, 2018) aporta una visión de las diferentes estimaciones de la emisión de los MPs en el ambiente y su destino final.

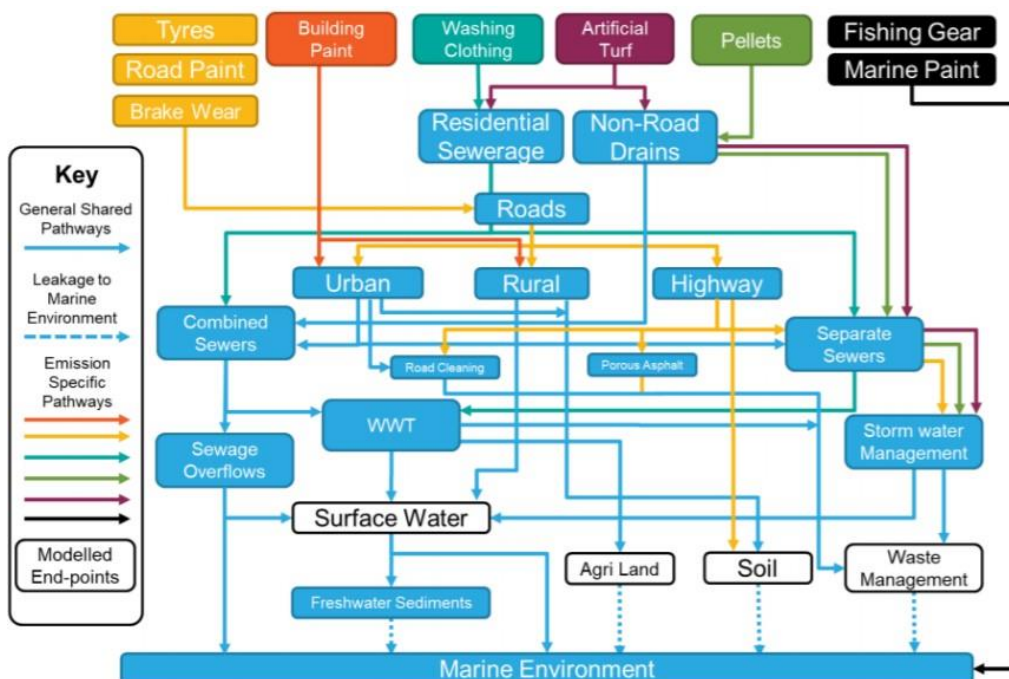


Figura 2. Representación gráfica del complejo modelo de vías de emisión de los MPs primarios. (European Commission's, Scientific Advice Mechanism (SAM)), (Hann *et al.*, 2018). Esquemáticamente representa las diferentes rutas o vías de emisión de los MPs primarios desde la fuente hasta su hundimiento. En general, se estima que alrededor del 48% de estos microplásticos primarios terminan en el océano, y el 52% restante queda atrapado en el suelo o en los lodos de depuración.

Tal y como se aprecia en la *Figura 1*, parece ser que acerca del 80% de los residuos marinos se originan a partir de las fuentes terrestres. Por lo que dado su origen antropogénico, se podría esperar que las

áreas de pesca de trasmallo (en las que los barcos operan en aguas poco profundas, más cercanas de la tierra) estén expuestas a la entrada de MPs procedentes de las áreas urbanizadas y de la actividad turística, en comparación con las zonas de pesca de arrastre más alejadas de la costa (Galgani *et al.*, 2000; Alomar *et al.*, 2017).

Sin embargo, en áreas urbanizadas como en el Puerto de Andratx de la isla de Mallorca (área del presente estudio), se encontró (Compa & Deudero, 2018) menor abundancia de plásticos de superficie, coincidiendo con estudios previos que indican menor abundancia de fragmentos plásticos en el fondo marino para esta área (Alomar *et al.*, 2016). Por lo que dichos resultados parecen indicar que los residuos plásticos no se originen en fuentes terrestres, si no que llegan con las fuerzas hidrodinámicas de las aguas circulantes y no se están asentando y acumulando en el fondo marino o en la superficie marina de estas áreas (Compa & Deudero, 2018).

Además, se ha comprobado que la distancia con respecto a la zona terrestre no tiene ningún efecto en los patrones de ingesta de MPs (Alomar *et al.*, 2017). Por lo que son los factores abióticos, como la geomorfología, las variables hidrodinámicas o la sedimentación (Galgani *et al.*, 2000) los que presentan un papel de vital importancia en el transporte, distribución y difusión de estas partículas en las áreas más distantes (Oliveira *et al.*, 2015). Y por tanto, es necesario tenerlos en cuenta (Galgani *et al.*, 2000) como parámetros explicativos de la ingesta de MPs en las especies de peces (Alomar *et al.*, 2017).

Con respecto a la composición de los plásticos, los polímeros más comúnmente encontrados en el ambiente marino son el polietileno (PE) de elevada y baja densidad, polipropileno (PP), poliéster, nylon y poliestireno (PS) (Alomar *et al.*, 2017; Andradý, 2011). Y en los ambientes acuáticos, los MPs normalmente se encuentran en diferentes formas físicas: fibras y films, fragmentos o esferas. Se cree que el poliéster y las fibras acrílicas derivan en mayor medida del lavado de ropa, mientras que los fragmentos son micropartículas sin una forma uniforme producidos principalmente por la fragmentación de macroplásticos (Karami *et al.*, 2016).

De hecho, los MPs de tipo filamentosos proceden de las aguas residuales, siendo los textiles la fuente más importante. Este tipo de filamentos se encuentran cerca de las zonas más urbanizadas mientras que los de tipo fragmentado son más comunes en las áreas marinas protegidas, libres de aguas residuales y de las aportaciones de la actividad antropogénica (Alomar *et al.*, 2017). De hecho, Alomar *et al.*, 2016 indica que más del 60% de los MPs encontrados en Andratx (área del presente estudio) fueron de tipo filamentosos. Los cuales están relacionados con un elevado impacto antropogénico, a través de fuentes puntuales como es la descarga de lavadoras (Compa & Deudero, 2018). Por lo tanto, la contaminación de MPs en el área poblada de Andratx en concreto, podría atribuirse a la entrada de aguas residuales en lugar de la fragmentación de grandes partículas de plástico en partículas más pequeñas (Alomar *et al.*, 2016).

En referencia a los polímeros plásticos, el polietileno tereftalato es usado en la manufacturación de botellas, y es el polímero más común que se ha identificado en el estómago del salmonete de roca (*Mullus surmuletus*) (Alomar *et al.*, 2017). Esto es debido a su flotabilidad positiva, las corrientes superficiales y la luz ultravioleta del sol que facilitan su fragmentación, lo que lleva a un aumento de las fuentes secundarias de MPs de PE (Cole *et al.*, 2011).

Además, las artes de pesca están compuestas de plástico resistente incluyendo polímeros como el nylon, poliamida, poliéster o el propio PE de tereftalato (Alomar *et al.*, 2017). De hecho, el PE de elevada densidad (HDPE) y el PE de baja densidad (LDPE) corresponden al 12% y 17% del total de los plásticos utilizados a nivel europeo respectivamente (Karami *et al.*, 2016).

Sin embargo, cuando se trata de la ingesta de MPs en especies de peces, es necesario tener en cuenta que las fibras detectadas no están siempre hechas de plástico. Y el estudio de Alomar *et al.*, (2017) llevado a cabo en 417 individuos de *M. surmuletus* para estudiar la ingesta de MPs y sus efectos es

una prueba de ello. Ya que se determinó que a cerca de un tercio de los polímeros analizados (30.30%) estaban compuestos de celofán. Siendo este compuesto raramente identificable en otras especies de peces, dado que se incluye en el envasado de tabaco, así como en los envoltorios y en los residuos del embalaje, y ha sido aislado e identificado de muestras de agua de mar y de organismos marinos.

En base al Sistema Globalmente Harmonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (GHS) de las Naciones Unidas, más del 50% de los plásticos están asociados con monómeros peligrosos, aditivos y biproductos químicos (Rochman *et al.*, 2013). Dichos aditivos plásticos, comúnmente conocidos como “plastificantes”, se incorporan en los plásticos durante el proceso de producción con la finalidad de cambiar las propiedades o extender la vida útil del mismo. Proporcionando resistencia al calor; como los éteres de polibromodifenilos (PBDEs), al daño oxidativo (nonilfenol) y a la degradación microbiana (triclosán) (Cole *et al.*, 2011). Por lo que mejoran las propiedades del producto final, haciéndolo más estable, duradero y resistente a la degradación (Alomar *et al.*, 2017).

Un ejemplo es el monómero carcinogénico de cloruro de polivinilo (PVC), el componente básico de construcción de las tuberías que transportan el agua potable (Rochman *et al.*, 2013). Este monómero presenta una elevada probabilidad de terminar en el ambiente marino debido a su uso diverso en la manufacturación de diferentes productos a nivel global (Pedà *et al.*, 2016). Otro ejemplo, es el bifenol A, el cuál es ampliamente utilizado en la manufacturación de plásticos policarbonatados y resinas epóxicas como plastificante (Alomar *et al.*, 2017), siendo un constituyente en policarbonato que se usa en envases de alimentos y bebidas (Cole *et al.*, 2011).

Además de estos, los PBDEs son aditivos de varios plásticos (Rochman *et al.*, 2013), y son utilizados como ignífugos en equipos electrónicos, muebles para el hogar, textiles y materiales de construcción. Siendo estos últimos, muy similares a los bifenilos policlorados (PCBs) en estructura, así como en sus propiedades persistentes y bioacumulativas (Turyk *et al.*, 2008).

Estos aditivos son una preocupación ambiental, ya que prolongan los tiempos de degradación del plástico pudiendo filtrarse e introducir productos químicos potencialmente peligrosos para la biota (Cole *et al.*, 2011). Dado que normalmente estos aditivos, no están ligados a los polímeros, y pueden filtrarse del plástico degradándose una vez en el ambiente (Alomar *et al.*, 2017). De hecho, la polimerización incompleta durante la formación de los plásticos permite la migración de los aditivos fuera de la matriz sintética de los plásticos. Aunque el grado en el que estos aditivos se filtran de los plásticos depende del tamaño del poro, de la matriz del polímero (el cuál es variable según el polímero), el tamaño y propiedades del aditivo, además de las condiciones ambientales (Cole *et al.*, 2011).

No obstante, aún se desconoce el grado en el que los productos químicos asociados con los desechos plásticos a través de la absorción ambiental o el proceso de fabricación, se bioacumulan en los animales como consecuencia de la ingestión. Aun así, existe evidencia de estudios de laboratorio que incluyen la bioacumulación de PBDEs, en grillos por ingestión de espuma de poliuretano y mayor concentración de PCBs en gusanos de arena alimentados con poliestireno con PCBs absorbidos.

Además de los PBDEs y los PCBs, mencionados, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), son un subproducto de la fabricación del plástico (Rochman *et al.*, 2013). Pues se trata de un grupo de compuestos químicos que se encuentran naturalmente en los combustibles fósiles, y se forman como subproductos durante la combustión incompleta de materia orgánica tales como; carbón, petróleo, madera, basura, gas o tabaco entre otros. Existiendo exclusivamente como mezclas complejas, y han sido utilizadas en la producción de plástico, tintes, medicinas y pesticidas (Karami *et al.*, 2011).

Dicho esto, queda evidenciada una de las mayores preocupaciones, y ésta reside no sólo en la exposición de la vida silvestre a la compleja mezcla del material plástico, si no también, a los químicos

asociados al plástico (incluidos los ingredientes químicos, y los que se absorben de la naturaleza) (Rochman *et al.*, 2013).

2.2 Interacción de los microplásticos con los contaminantes del ambiente

El impacto químico de los MPs está relacionado con el hecho de que, los diferentes químicos se adsorben en la superficie de los plásticos. Dado que los plásticos están hechos de materiales elevadamente hidrofóbicos, y que los propios MPs actúan como reservorios de químicos tóxicos en el ambiente, los MPs pueden ser vectores de contaminantes hidrofóbicos (Cole *et al.*, 2011; Prokić *et al.*, 2019). Por tanto, los peligros que van asociados a los desechos de plástico, incluyen componentes físicos del material e ingredientes químicos, además de los químicos ambientales absorbidos (ej: sustancias persistentes bioacumulativas y tóxicas (PBTs), dicloro-difenil tricloro etano (DDTs), o PAHs, además de los metales (Alomar *et al.*, 2017; Gewert *et al.*, 2015; Rochman *et al.*, 2013).

En particular, los químicos que presentan toxicidad son el resultado de la lixiviación de aditivos (como los ftalatos y el bifeno A) además de la capacidad de los MPs para absorber POPs (Pedà *et al.*, 2016). De hecho, varios polímeros como el PP, PE, PS y el PVC, tienen una elevada predisposición para absorber hexaclorociclohexanos, PAHs, bencenos clorados, DDTs. En este sentido, los plásticos son capaces de magnificar la influencia adversa de los diferentes contaminantes en el ambiente (Prokić *et al.*, 2019). Por lo que, los plásticos que han entrado en contacto con el ambiente marino, (pudiendo interactuar con los contaminantes del medio) se denominan plásticos “marinados”. A diferencia de los plásticos “vírgenes”, los cuáles no han estado en contacto directo con el ambiente marino.

Los contaminantes orgánicos persistentes (POPs), que incluyen; PCBs (utilizados para fines industriales, en transformadores eléctricos), PAHs (derivados de la contaminación por petróleo y la combustión de combustibles fósiles) y los pesticidas organoclorados como el DDTs (utilizados como insecticida agrícola en el año 1960 y prohibido en el año 1970 en muchos países) son químicos estables, lipofílicos que se adhieren y concentran en la superficie hidrofóbica del plástico (Endo *et al.*, 2005; Teuten *et al.*, 2009). Dada la naturaleza persistente de estos químicos y sus metabolitos, se encuentran en varios compartimentos ambientales, incluyendo el agua de mar y sedimentos superficiales (Endo *et al.*, 2005). Además, se localizan en elevadas concentraciones en la microcapa de la superficie marina, donde los MPs de baja densidad también son más abundantes (Cole *et al.*, 2011).

En particular, los POPs hidrofóbicos se pueden llegar a acumular con el tiempo en la superficie del plástico, resultando en mayores concentraciones en la superficie de los plásticos que en el propio ambiente (Alomar *et al.*, 2017; Gewert, *et al.*, 2015). De hecho, Mato *et al.*, (2001) observa que las concentraciones de PCBs en pellets de PP es 10^6 veces mayor que en la columna de agua que les rodea. Esto es debido a la mayor área de superficie-volumen de los MPs, por lo que estos absorben mayores concentraciones de contaminantes que los plásticos de mayor tamaño (Alomar *et al.*, 2017). Por tanto, este elevado potencial de acumulación, sugiere que los pellets de plástico sirven como un medio de transporte y una fuente potencial de químicos tóxicos en el ambiente marino (Mato *et al.*, 2001).

El PE en particular, presenta una mayor afinidad por los contaminantes orgánicos que otros polímeros producidos en masa y es el componente más grande en la producción de plástico a nivel mundial (29%). Siendo uno de los polímeros más comúnmente muestreados y recuperados como residuos acuáticos (Rochman *et al.*, 2013, Megara *et al.*, 2018). Y ha demostrado adsorber un rango de contaminantes orgánicos como los PAHs (Megara *et al.*, 2018 ; Frias *et al.*, 2010).

En concreto, los PAHs, están ampliamente distribuidos en el ambiente marino. Entre estos, se encuentra el fenantreno (P) (con tres anillos de benceno fusionados), un PAHs que ha demostrado causar toxicidad en peces y en humanos (Karami *et al.*, 2016). Además del fluorantreno y el fenantreno; el pireno (PY) (con cuatro anillos de benceno fusionados) y el naftaleno, suelen ser los PAHs más

abundantes que se han encontrado adheridos a muestras de MPs (Frias *et al.*, 2010). Por lo que, los riesgos derivados de los MPs vienen del mismo material así como de los químicos y contaminantes absorbidos en la superficie (Alomar *et al.*, 2017).

En definitiva, la adsorción de los contaminantes a los residuos plásticos dependen de varios factores como las características físico-químicas del polímero, su posición, color, forma y tamaño (Prokić *et al.*, 2019). Además de los factores ambientales como la temperatura o el grado de desgaste inducido por los procesos de fotooxidación del ambiente marino (Alimi *et al.*, 2018; Endo *et al.*, 2005).

La fotooxidación en polímeros de PE desarrolla con el tiempo grietas visibles en la superficie de este. Y se ha indicado que un incremento de la presencia de grietas puede incrementar la sorción de contaminantes. Mientras que un incremento en la polaridad, a través de la introducción de oxígeno en el polímero hospedador, puede deprimir la sorción de los compuestos hidrofóbicos (Endo *et al.*, 2005). Por lo que los procesos de desgaste pueden influir en la sorción de contaminantes a los residuos plásticos.

Además, la cristalinidad del polímero también influye marcadamente en la adsorción. De hecho, los contaminantes orgánicos con baja cristalinidad como los PE, acumulan en mayores concentraciones en comparación con los polímeros de elevada cristalinidad como el PVC no plastificado y el PS (Magara *et al.*, 2018).

Otro factor a tener en cuenta es el color, ya que los MPs incoloros absorben más PCBs que los plásticos coloreados (Alimi *et al.*, 2018; Endo *et al.*, 2005; Prokić *et al.*, 2019). Esto se puede explicar debido al hecho de que los pellets que presentan mayor decoloración han tenido un mayor tiempo de residencia en el océano y por tanto, mayor tiempo para oxidarse. Y como resultado, han adsorbido más PCBs. Sin embargo, otra posible explicación es que la presencia de aditivos antioxidantes en los plásticos aumente la sorción de PCBs, cambiando la naturaleza absorbente del polímero. Dado que, es conocido que los aditivos (añadidos durante el proceso de fabricación) influyen la estructura del polímero y las características de difusión del plástico (Endo *et al.*, 2005).

En lo que respecta a la densidad, investigaciones (Mato *et al.*, 2001; Pedà *et al.*, 2016) han demostrado que los coeficientes de difusión química fueron frecuentemente más elevados para los MPs con una densidad menor, con respecto a aquellos con mayor densidad. Esto es debido a que los químicos tienen unas velocidades de difusión más lentas en los residuos MPs con una alta densidad (Prokić *et al.*, 2019).

La adsorción de contaminantes es un proceso constante, sin embargo, Mato *et al.*, (2001) demuestra que no es un proceso rápido. Dado que los pellets vírgenes expuestos durante un periodo de 6 días a contaminantes marinos, no llegaron a su valor máximo de concentración, aún que la adsorción fue constante (Cole *et al.*, 2011).

Por otro lado, la sorción de químicos en los MPs pueden transferir sustancias químicas, dañinas, persistentes, bioacumulativas y tóxicas en la cadena alimenticia, pudiendo poner en peligro la vida marina y el ambiente (Wang *et al.*, 2018; Rochman *et al.*, 2013). Sin embargo, Koelmans *et al.*, (2016) sugiere que los MPs pueden tener una importancia limitada como vector en comparación con otras partículas suspendidas en la columna de agua. De modo que, la función de los MPs como vehículo para la introducción de sustancias tóxicas en los organismos y en la cadena trófica parece ser debatible (Pedà *et al.*, 2016). A diferencia de otros investigadores, quienes demuestran el potencial de los MPs para alterar las interacciones contaminante-organismo (Magara *et al.*, 2018; Rohman *et al.*, 2013).

En definitiva, y a pesar de que estudios de laboratorio y de campo han demostrado el consumo de MPs en el rango de la biota marina, no está claro si un contaminante de este tipo puede pasar de forma rutinaria a la cadena alimentaria (Cole *et al.*, 2011). Y esto es debido a la ubicuidad de los PCBs en el

ambiente, una característica que dificulta diferenciar la bioacumulación a través del plástico, de la bioacumulación a través de la cadena trófica (Rochman *et al.*, 2013). Aun así, la transferencia de químicos tóxicos a la biota marina a través de la ingesta de MPs presenta una preocupación significativa (Cole *et al.*, 2011).

2.3 Daños fisiológicos derivados de la ingesta de microplásticos

Las características físico-químicas de los MPs y sus pequeñas dimensiones, facilitan su dispersión en el ecosistema marino, donde son ubicuos y quedan a disposición de la cadena trófica (Pedà *et al.*, 2016). Esto, junto con la liberación de POPs o la filtración de los aditivos de la superficie del mismo (ya que no se encuentran unidos covalentemente (Alomar *et al.*, 2017), o la liberación de químicos producidos por la degradación del propio polímero (Gewert *et al.*, 2015), los convierte en un peligro potencial. Volviéndose accesibles para los organismos, pudiendo entrar en las células e interactuar químicamente con las moléculas biológicas (Alomar *et al.*, 2017).

De hecho, los fragmentos más pequeños de los polímeros formados por la degradación abiótica en el ambiente, (puede iniciarse térmica, hidrolítica o por radiación UV) pueden pasar a través de la membrana celular y ser biodegradados por las enzimas celulares (Gewert *et al.*, 2015). Por tanto, el impacto ecológico de los plásticos puede ser físico, químico y biológico (Prokić *et al.*, 2019).

En lo que respecta al impacto físico en los animales, implica enredo e ingestión, siendo el enredo mucho más común. De hecho, el Convenio sobre la Diversidad Biológica (UNEP, GEF, & Convention on Biological Diversity, 2012) indica que el enredo letal y la ingesta de fragmentos de plástico por animales marinos se ha incrementado un 40% en la última década (Prokić *et al.*, 2019).

En primer lugar, la ingesta de los plásticos puede ser directa e indirecta. La ingesta directa, está implícita en la ingesta de alimentos que resulta del consumo no intencional a través de la ingestión no selectiva (por alimentadores de filtro). O la selección activa, cuando los animales comen plásticos en lugar de alimento. A diferencia de esta, la ingesta indirecta describe la transferencia trófica como una consecuencia del consumo de presas contaminadas por los depredadores (Prokić *et al.*, 2019).

Además, el consumo de contaminantes (DDTs, PAHs, PCBs) en el ambiente marino, puede ocurrir a partir de: los sedimentos, las partículas en suspensión, la columna de agua o fuentes de alimentos. Aun así, la mayoría de vías de entrada dependerán de la dieta en particular y de los estilos de vida ecológicos de los organismos (Livingstone, 2001).

En segundo lugar, el impacto de los MPs en los organismos acuáticos podría ocurrir a través de tres modos de acción posteriores a la ingesta: (1) daño digestivo o falsa sensación de saciedad que obstaculiza la ingesta nutricional, (2) lixiviación de los aditivos plásticos (por ejemplo, monómeros) y su captación en los tejidos y (3) la adherencia de otros contaminantes a los MPs que posteriormente se liberan *in vivo* (Cole *et al.*, 2011).

El consenso en lo que respecta al papel de “efecto vector” de los MPs para los contaminantes orgánicos, sigue siendo eludible (Magara *et al.*, 2018). Sin embargo, el estudio llevado a cabo por Rochman *et al.*, (2013) concluye que el plástico depositado en el ambiente marino sirve como un vector para la bioacumulación de PBTs absorbidos por el plástico, sugiriendo que los residuos plásticos sirven como un vector para la bioacumulación de PBTs en la vida silvestre.

Dado que el epitelio intestinal es la fracción más importante para la absorción de los nutrientes, siendo en particular, la parte distal del intestino la sección más importante para la endocitosis de proteínas (Rombout *et al.*, 1985). Además de ser una de las vías para la captación de algunas sustancias tóxicas. No sorprende que sea uno de los órganos que se vea más afectado por la ingesta de MPs, mostrando

un cambio gradual, variando de moderado a severo en relación a los tiempos de exposición (Pedà *et al.*, 2016).

Es entonces, la combinación de tóxicos y partes del plástico lo que resulta extremadamente dañina para los animales, ya que puede inducir toxicidad hepática y patologías intestinales (Pedà *et al.*, 2016, Prokić *et al.*, 2019; Rochman *et al.*, 2013).

En relación con las patologías intestinales derivadas de la exposición crónica a MPs a través de la ingestión, el estudio de Pedà *et al.*, (2016), observa deterioro estructural y funcional del intestino de *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) tras estar expuestos por 90 días a pellets de PVC. Dado que, tras los 90 días de exposición, la mitad de los individuos (50%) de ambos tratamientos con MPs vírgenes y MPs contaminados, mostraron alteraciones severas. Destacando el desprendimiento evidente del epitelio por la lámina propia, el incremento de células de Rodlet, disepitelización masiva, decapitación de vellosidades y edema de la capa serosa, mucosa muscular y submucosa/ mucosa.

En cuanto al incremento de las células Rodlet, se trata de células que han sido encontradas en un rango muy amplio de tejidos (epitelios, piel, branquias, o intestino entre otros) en peces teleósteos de agua dulce y de agua salada. Sin embargo, su verdadera función u origen aún permanecen difusos (Manera & Dezfuli, 2004). A pesar de que se les ha asignado varias funciones, existe una evidencia emergente que sugiere que estas células presentan un papel en la respuesta inmune innata en peces y que pertenecen a la línea granulocítica (Bosi *et al.*, 2018). De hecho, el estudio de Bosi *et al.*, (2018) se posiciona a favor de que las células Rodlet de dos teleósteos; *Anguilla anguilla* y *Cyprinus carpio*, estén involucradas en el mecanismo de defensa contra los patógenos. Aun así, existen pocos artículos basados en estudios experimentales que hayan revelado la importancia de estas células como biomarcadores de la exposición a contaminantes y como biomarcadores del efecto de los xenobióticos. Ya que existe la posibilidad que estas células puedan ser buenos candidatos como biomarcadores, tanto cualitativos como cuantitativos para los agentes de estrés y químicos (Manera & Dezfuli, 2004).

Además de la modificación adversa de la función intestinal expuesta anteriormente, los plásticos pueden causar muchos problemas relacionados con la disminución de la capacidad de alimentación, las reservas de energía y la reproducción (Prokić *et al.*, 2019). Otras consecuencias biológicas de los químicos industriales, pesticidas o aditivos asociados a los MP's son los efectos estrogénicos (Alomar *et al.*, 2017; Sonnenschein & Soto, 1998) o la reducción de la producción de testosterona (Teuten *et al.*, 2009).

Se cree que los efectos reproductivos y endocrinos de estos químicos se deben a su habilidad para: (1) mimetizar los efectos de hormonas endógenas, (2) antagonizar los efectos de hormonas endógenas, (3) interrumpir la síntesis y el metabolismo de hormonas endógenas, y (4) interrumpir la síntesis y el metabolismo de receptores hormonales (Sonnenschein & Soto, 1998). De hecho, una amplia cantidad de químicos utilizados en actividades industriales (plastificantes, congéneres de PCBs, pesticidas o PBTs) y en el hogar, han demostrado alterar la fisiología normal y el sistema endocrino en organismos (Rochman *et al.*, 2013; Arukwe & Goksøyr, 1998). Ya que varios estudios *in vivo* e *in vitro*, indican que una clase importante de estos compuestos, los xenoestrógenos, (con estructura química diversa) son capaces de mimetizar la hormona natural del estrógeno (Arukwe & Goksøyr, 1998; Sonnenschein & Soto, 1998).

En referencia a los PCBs y sus congéneres, además de alterar el sistema endocrino, son agentes carcinogénicos que afectan el sistema inmunitario, nervioso y reproductor de los animales (Frias *et al.*, 2010). De hecho, el estudio de Hugla & Thomé, (1999) observa que estos contaminantes tuvieron un efecto dramático en los huevos de *Barbus barbatus*, ya que las hembras expuestas a una dieta tratada con PCBs no pudieron engendrar, resultando en la reducción de la fecundidad y de la tasa de eclosión.

Por otro lado, estudios experimentales han demostrado que la combinación de los plásticos y contaminantes absorbidos (PAHs, PCBs y PBDEs) ingeridos por peces causan toxicidad hepática y patología (Alomar *et al.*, 2017). Otros estudios de laboratorio revelan que la exposición a MPs, (polímeros como; PS, PVC y PE) como contaminantes individuales y en combinación con PAH, incluyendo (Flu); (1) afecta a la acumulación de PAHs, (2) induce un rango de efectos fisiológicos y celulares, incluyendo defensas antioxidantes (Magara *et al.*, 2018).

De hecho, Rochman *et al.*, 2013, observó que los peces (*Oryzias latipes*) expuestos a una mezcla de PE con contaminantes químicos adsorbidos del ambiente marino, bioacumularon dichos contaminantes y sufrieron toxicidad hepática, detectándose un adenoma hepatocelular en uno de los individuos (comprometiendo el 25% del hígado). Del mismo modo, aquellos peces alimentados con fragmentos de PE virgen también muestran signos de estrés. Aunque de forma menos severa que los peces alimentados con fragmentos de PE “marinados” (expuestos a contaminantes del ambiente marino). Concluyendo que la ingesta de PE es un vector para la bioacumulación de PBTs en peces. Y que la toxicidad derivada de la ingesta de plástico es una consecuencia de la sorción de ambos; los contaminantes adsorbidos y los materiales plásticos.

Entre los signos de estrés hepático (observados mediante análisis histológico) que mostraron los peces expuestos a los tratamientos con plástico marinado y plástico virgen destacan; un severo agotamiento del glucógeno (74% de los individuos del tratamiento con plástico marinado y en un 46% de los peces expuestos al plástico virgen), vacuolación de ácidos grasos (47% de los peces expuestos al tratamiento con plástico marinado y un 29% de los individuos expuestos al tratamiento con plástico virgen), necrosis celular (en el 11% de los peces expuestos al tratamiento con plástico marinado) y lesiones (Rochman *et al.*, 2013). Cabe destacar que la drástica reducción de glucógeno mencionada puede deberse al efecto directo de los PCBs en el metabolismo de los carbohidratos. Ya que se considera como un indicador de un estatus hipoenergético, probablemente relacionado con el coste energético de la detoxificación (Hugla & Thomé, 1999).

Recientemente, ha empezado a emerger cierta consistencia en lo que respecta a la capacidad de los MPs de provocar un efecto directo en el sistema de estrés oxidativo (Magara *et al.*, 2018). De hecho, la exposición de los animales marinos a ciertos compuestos tóxicos puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno, con el consiguiente daño a macromoléculas y alteraciones en los niveles de defensas antioxidantes (Sureda *et al.*, 2006). Por lo que los cambios en los niveles endógenos de las defensas antioxidantes han sido propuestos como biomarcadores de la contaminación acuática (Sureda *et al.*, 2006). Y la medición de los niveles de estrés oxidativo está muy extendida en los estudios relacionados con los mecanismos de toxicidad ambiental y ecotoxicidad en organismos expuestos a contaminantes (Prokić *et al.*, 2019).

2.4 El estrés oxidativo derivado de la ingesta de microplásticos

En animales, el metabolismo que inactiva las moléculas exógenas se da principalmente en el hígado. Estas moléculas que pueden ser tóxicas, han de ser metabolizadas rápidamente y/o excretadas para evitar su acumulación en el organismo (Sureda *et al.*, 2006). Así mismo, el metabolismo celular oxidativo es una fuente endógena y continua de especies de oxígeno reactivas (ROS), resultantes de la reducción parcial del oxígeno molecular (Lushchak, 2011), el cuál puede dañar muchos de los componentes celulares (Sureda *et al.*, 2006). De hecho se estima que acerca de un 1-3% del oxígeno consumido en animales se convierte en ROS (Halliwell & Gutteridge, 1991).

Es necesario destacar que estas moléculas altamente reactivas, pueden interaccionar con otras moléculas afectando de forma adversa a moléculas de gran importancia biológica como el ADN, proteínas y lípidos. El daño progresivo de estas moléculas puede desatar respuestas inflamatorias, además de daño celular y tisular e inducción de cambios degenerativos, los cuales pueden resultar en

senescencia celular y la muerte, disfunción orgánica, además de la pérdida y reducción del rendimiento del organismo (Lushchak, 2011; Prokić *et al.*, 2019).

Además de los efectos directos en la salud individual, el estrés oxidativo también puede tener consecuencias determinantes en el desarrollo, longevidad y la reproducción. Aun así, debido tanto a su elevada capacidad de provocar daño como a su actividad biológica, en condiciones normales, el metabolismo de ROS permanece bajo control, sin que sus concentraciones se excedan (Lushchak, 2011). Dado que las ROS también podrían actuar como mensajeros moleculares para activar respuestas adaptativas a través de vías de señalización sensibles a las reacciones de oxidación-reducción (redox), con el fin de mantener la homeostasis celular oxidante-antioxidante (Ji, Gomez-Cabrera & Vina, 2006).

Las ROS producidas en los sistemas biológicos son detoxificadas y mantenidas bajo control por las defensas antioxidantes, que generalmente son ubicuas en los diferentes tipos de tejidos animales. De hecho, se han encontrado ampliamente en organismos acuáticos. Y su presencia, propiedades y otras características han sido revisadas de forma extensa (Livingstone, 2001). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, la concentración de ROS puede cambiar, ya que estas se generan y se eliminan continuamente, por lo que su concentración es un parámetro dinámico y un cambio en la concentración de ROS, puede derivar en la alteración del estado redox, comúnmente conocido como estrés oxidativo (Lushchak, 2011).

En definitiva, el estrés oxidativo se genera por el desequilibrio que se produce entre pro-oxidantes, como las ROS y el sistema de protección antioxidante (Magara *et al.*, 2018). Y es debido a la exposición a ciertos xenobióticos lo que puede incrementar la concentración de especies reactivas y/o subsecuentemente disminuir las defensas antioxidantes (Prokić *et al.*, 2019). Ya que se ha evidenciado que la detoxificación de los contaminantes produce especies reactivas (Livingstone, 2001). Puesto que, la autooxidación de ciertos componentes celulares y de xenobióticos (oxidación, que puede ocurrir al aire libre o ir en presencia de oxígeno y/o radiación UV, forma peróxidos e hidroperóxidos) parece ser responsable de la producción de una cantidad sustancial de ROS (Lushchak, 2011).

Por lo que una condición de estrés puede inducir o inhibir el sistema antioxidante, en función del tiempo de exposición y de la intensidad del agente estresante. De modo que, el control del estrés oxidativo es crucial para el funcionamiento normal de los organismos (Prokić *et al.*, 2019).

Con el fin de garantizar el control de este proceso dinámico, las células contienen una red compleja de defensa antioxidante que elimina o previene la generación de ROS, detoxifican toxinas y/o contaminantes y repara o elimina las moléculas dañadas. El sistema antioxidante comprende un grupo de enzimas específicas como; superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) que actúan detoxificando el ROS generado (Sureda *et al.*, 2006; Sureda *et al.*, 2018). Además de estas, existe otro componente enzimático cuya actividad está envuelta en la detoxificación de fase II y en la excreción y biotransformación de xenobióticos y sus metabolitos; el glutatión S-transferasa (GST) (Livingstone, 2001; Monteiro *et al.*, 2006; Sureda *et al.*, 2018a). Y han sido estudiadas en la evaluación de los efectos de los MPs (Prokić *et al.*, 2019), además de representar importantes rutas metabólicas de protección (Livingstone, 2001).

Por lo que existe un interés incipiente en lo que respecta a la evaluación de los marcadores de estrés oxidativo como clave en la investigación del estrés oxidativo en organismos (Lushchak, 2011). De hecho, los biomarcadores de estrés oxidativo, han sido utilizados para evaluar el rango de impacto de los xenobióticos (Magara *et al.*, 2018). Dada la evidencia de que los organismos acuáticos expuestos a contaminantes como los PAHs, presentan estrés oxidativo severo, (Livingstone, 2001; Lushchak, 2011; Magara *et al.*, 2018), (cuando la tasa de generación de ROS supera la tasa de eliminación), acompañado de la estimulación de una respuesta protectora y de un consiguiente aumento de marcadores oxidativos (Sureda *et al.*, 2006).

En concreto, los peces, son especialmente interesantes para el estudio del estrés oxidativo, debido a las propiedades del ambiente acuático y las relaciones que establecen con este (Sureda *et al.*, 2006). Así mismo, dada la diversidad de contaminantes en ambientes acuáticos, las respuestas de biomarcadores en peces son el resultado neto de las interacciones químicas (Karami *et al.*, 2016). Sin embargo, es importante evitar adoptar una visión aislada de las respuestas a biomarcadores individuales, ya que se debe de examinar el conjunto de marcadores o el “perfil de los biomarcadores” para entender el mecanismo subyacente (Magara *et al.*, 2018).

De hecho, las enzimas que forman parte de la primera línea de defensa (SOD, CAT, GPx, entre otras) son marcadores potencialmente buenos para evaluar el daño oxidativo inducido por los MPs (Alomar *et al.*, 2017; Prokić *et al.*, 2019). Además, estas enzimas están estrechamente relacionadas con la producción del radical anión superóxido, el cuál puede ser el responsable de la inducción del estrés oxidativo a partir de los MPs (Prokić *et al.*, 2019).

Concretamente la función de la SOD se basa en la eliminación del anión superóxido (Sureda *et al.*, 2018), por medio de la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva debido a que presenta una actividad más elevada que el oxígeno molecular (Lushchak, 2011). Por consiguiente, el H₂O₂ producido será posteriormente eliminado por la acción conjunta de la CAT y de la GPx. Por lo que estos elementos catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno a productos no dañinos. Del mismo modo, la GSH-Px también puede actuar en otros peróxidos además del H₂O₂ (Prokić *et al.*, 2019).

Se debe de tener en cuenta que, el glutatión (GSH), es un componente no enzimático del sistema antioxidante que puede estar envuelto directamente en la eliminación de una gran variedad de radicales libres, o indirectamente a través del sistema glutatión-dependiente (GPx, GST, GR). Específicamente, el glutatión es un cofactor en las reacciones de GPx, en las que la GST presenta un papel en la prevención del daño oxidativo por medio de la conjugación de los productos de deshecho de los peróxidos de lípidos a glutatión (Prokić *et al.*, 2019).

Es evidente que el glutatión se marca como uno de los componentes clave del sistema antioxidante en la prevención de la oxidación de lípidos y proteínas inducida por xenobióticos ambientales. Pues, para mantener el funcionamiento normal del glutatión, la GR reduce la forma oxidada del glutatión (GSSG) a GSH (Prokić *et al.*, 2019).

Otro componente principal del sistema antioxidante es la GST, esta enzima está envuelta en la fase II de los procesos de detoxificación, produciendo un conjugado de glutatión más hidrofílico del compuesto tóxico favoreciendo su eliminación (Alomar *et al.*, 2017; Sureda *et al.*, 2006). Se trata de un biomarcador comúnmente utilizado en el estrés oxidativo (Magara *et al.*, 2018), concretamente como marcador de detoxificación en organismos acuáticos y como biomarcador de la contaminación del agua (Sureda *et al.*, 2006).

Además de los marcadores mencionados, otro de los métodos más frecuentemente utilizados es la monitorización de la peroxidación lipídica basada en la medición de uno de los productos finales (Lushchak, 2011). El Malondialdehído (MDA), como producto final del daño oxidativo lipídico, es usado como un biomarcador de la peroxidación lipídica (Alomar *et al.*, 2017; Sureda *et al.*, 2006). Por tanto, se espera la activación de enzimas y el incremento de los niveles de MDA en las especies de peces expuestas a ciertos compuestos tóxicos, así como la utilización de biomarcadores de estrés oxidativo y detoxificación en organismos acuáticos (Alomar *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2016).

Finalmente, es necesario tener en cuenta que mucha de la literatura disponible sobre los efectos potenciales de los MPs en el estrés oxidativo o los marcadores inflamatorios en peces se han llevado a cabo bajo condiciones de laboratorio. Por lo que, en estos estudios (Alomar *et al.*, 2017), los

resultados son variables ya que dependen de la especie utilizada, el tiempo de exposición a partículas de MPs según el tipo y el tamaño de los mismos.

2.5 Biología de *Sparus aurata*

Para este estudio en particular, se ha escogido la especie *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) comúnmente conocida como dorada. Es una especie común del mar Mediterráneo y presenta un gran interés comercial. Puesto que, gran parte de la dorada procede de la acuicultura y la Unión Europea es; con diferencia, el mayor productor mundial. Siendo Grecia el principal productor, seguida de España. En los años 80, se produjo con éxito en cautividad y se desarrollaron sistemas intensivos de cultivo (sobre todo jaulas marinas). Desde entonces, esta especie se ha convertido en uno de los principales productos de la acuicultura europea (PESCA Y ACUICULTURA EN EUROPA, 2012).

Con respecto a su ciclo reproductivo, los juveniles tras nacer en mar abierto durante octubre y diciembre generalmente migran a principios de la primavera hacia aguas costeras protegidas, donde pueden encontrar abundantes recursos tróficos y temperaturas más suaves. A finales del otoño regresan al mar abierto, donde se reproducen los peces adultos. En el mar abierto, la dorada se encuentra generalmente en praderas rocosas de pastos marinos (*Posidonia oceanica*), aunque también se encuentran en suelos arenosos. Se trata de una especie hermafrodita protándrica. Y la madurez sexual se desarrolla en los machos a los 2 años de edad y en las hembras a los 2-3 años de edad.

Debido a sus hábitos eurihalinos y euritermos, esta especie se puede encontrar en ambientes marinos y en aguas salobres, como lagunas costeras y áreas de estuarios, en particular, durante las etapas iniciales de su ciclo de vida (Colloca & Cerasi, 2009). Por lo que, gracias a su caracterización como especie eurioica, resulta ser una especie adecuada para el estudio del impacto de la exposición a MP's en condiciones de laboratorio. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en cautiverio, la inversión sexual está condicionada por factores sociales y hormonales (Colloca & Cerasi, 2009).

3. OBJETIVOS

Dado que, varios estudios han demostrado la ingesta de MPs por parte de organismos marinos como: aves marinas, cetáceos, teleósteos, elasmobranchios, mejillones y zooplancton (Pedà *et al.*, 2016). Además, se ha hipotetizado que los peces depredadores ingieren compuestos plásticos similares a las presas como los sálpidos o sifonoforados, mientras que las fibras azuladas, blanquecinas o de coloración más clara similares a las presas se han identificado en peces planctívoros. Con esto, se aporta la evidencia de la confusión visual que se da entre las presas y los MPs (Alomar *et al.*, 2017).

En la actualidad, existen pocos estudios basados en condiciones ambientales naturales que *expongan* los efectos fisiológicos derivados de la ingestión de MPs y químicos asociados (Alomar *et al.*, 2017). Además, los cambios en los niveles endógenos del sistema de defensa antioxidante han sido propuestos como biomarcadores de contaminantes acuáticos. Y se ha evidenciado que los organismos expuestos a contaminantes presentan un incremento en la producción de ROS, derivando en daño oxidativo.

El objetivo general del presente trabajo es valorar los efectos de activación de especies enzimáticas derivados de la exposición a diferentes tipos de dietas enriquecidas con microplásticos en doradas (*Sparus aurata*) durante un período de 90 días bajo condiciones controladas.

Los objetivos específicos son:

- Valorar los efectos de activación de enzimas de estrés oxidativo mediante el uso de biomarcadores (SOD, CAT, GPx, GST, GR y MDA) en ejemplares de *S. aurata* expuestos a diferentes tipos de dietas enriquecidas con microplásticos a partir de muestras de tejido hepático.
- Comparar los resultados obtenidos para las respuestas de los biomarcadores de estrés oxidativo (SOD, CAT, GPx, GST, GR y MDA) en *S. aurata*, para los diferentes tipos de dietas enriquecidas con plástico.
- Revisión de la literatura existente sobre el impacto de la ingesta de MPs en especies de peces y el uso de biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores del impacto de los MPs y contaminantes del ambiente marino.

4. METODOLOGÍA

4.1 Área de estudio

En primer lugar, este estudio pertenece al proyecto ACUIPLASTIC; “Plásticos derivados de la acuicultura y efectos en las redes tróficas marinas”, con referencia CTM2017-88332-R del programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientado a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica de Innovación.

Dicho experimento tuvo lugar en las instalaciones del laboratorio de LIMIA (Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuicultura), localizado en el municipio del Puerto de Andratx (Islas Baleares, España), y cuenta con las infraestructuras necesarias para la investigación en la acuicultura.

Se utilizaron anques rectangulares con un volumen de 5.000 L. Estos tanques estaban localizados en el interior del laboratorio para garantizar las mismas condiciones fisicoquímicas en cada tanque.

4.2 Tratamientos

Se aplicaron tres tratamientos diferentes mediante dieta. Cada réplica constaba inicialmente de 100 peces de la especie *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), tratándose de individuos juveniles.

La composición de la dieta era la misma para los tres tratamientos, en dos tratamientos (Virgen y Marinado) la dieta estaba enriquecida con un 10% de plástico tipo polietileno de baja densidad (LDPE).

- **Control (C):** La dieta consistió en una alimentación estándar, pienso comercial. Este tratamiento se dispuso en el tanque troncocónico, con separaciones entre C2 y C3. Y un tanque circular para el C1.
- **Virgen (V):** La dieta consistió en una alimentación enriquecida con microplásticos de tipo LDPE. Cada réplica fue dispuesta en un tanque circular (Imagen 4).
- **Marinado (M):** La dieta consistió en una alimentación enriquecida con microplásticos de tipo LDPE. Este tipo de plástico fue depositado en el mar por un periodo de dos meses, en un área de impacto antropogénico (Puerto de Andratx), con el fin de enriquecer el plástico con contaminantes. Estableciéndose el mismo esquema y tipo de tanque que en el Virgen.

Los peces fueron alimentados diariamente utilizando un alimentador automático con un ciclo de tiempo de 12h. La cantidad de alimento fue variable dependiendo de la biomasa (tamaño y número de peces del tanque, normalmente se suministró entre 50-75g de alimento).

4.3 Programación

El proyecto ACUIPLASTIC se inició el 16/10/2018 y finalizó el 13/02/2019, y consistió en 5 muestreos en diferentes marcos de tiempo; iniciando en T0, T30, T60, T90 y finalizando en T120 (los muestreos se realizaron cada 30 días) como se muestra en la imagen 3. Cabe destacar que antes del muestreo en el período T0, todos los peces fueron alimentados con el mismo alimento, y empezaron a ser alimentados con la dieta específica tras el primer muestreo. Además, no se alimentó a los peces el día anterior al muestreo. Añadiendo que, se necesitaron 3 días para realizar el muestreo; en el día 1 se muestreó el tratamiento Control (C) (con las 3 réplicas), en el día 2 se muestreó el tratamiento Virgen (V), y el día 3 el tratamiento marinado (M). Para este estudio en particular, se han utilizado las muestras recogidas del muestreo del período T90 (tras 90 días desde el inicio del experimento).

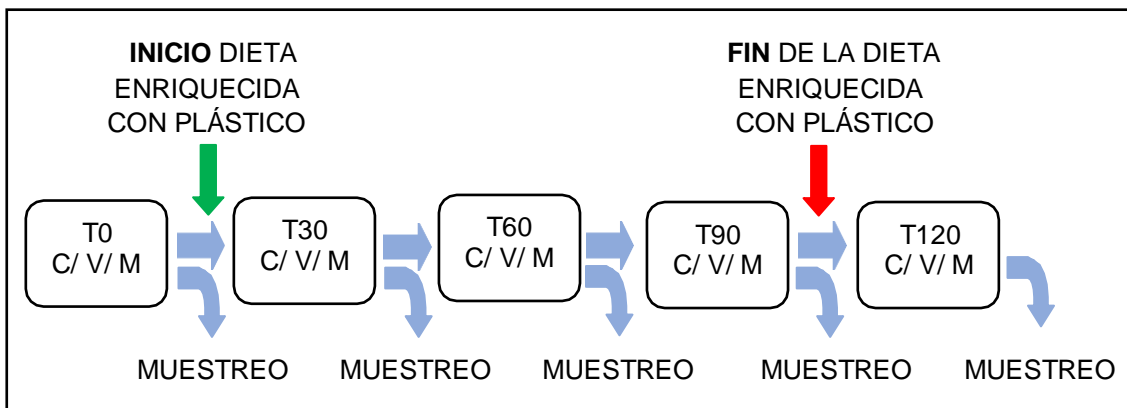


Imagen 3. Diagrama representativo del programa del proyecto ACUIPLASTIC.

4.4 Muestreo

Para el estudio del estrés oxidativo (ROS) en particular, se utilizaron muestras de tejido hepático, por lo que se llevó a cabo la captura de 12 individuos de cada tratamiento para el periodo T90 (n=36), y se depositaron en un tanque de menores dimensiones. A continuación, se fueron colocando uno tras uno en un tanque más pequeño con un anestésico MS22/fenoxietanol (1g MS22 /fenoxietanol en 10 L de agua) (Imágenes 4 y 5). Se realizaron fotografías individuales para el posterior análisis morfométrico, registro del peso corporal (g) y longitud total (cm).

Los peces fueron diseccionados por la apertura de la cavidad abdominal (Imagen 6), extrayéndose el paquete de órganos. Para la extracción del hígado (localizado en la zona ventral de la columna vertebral), se diseccionó en diversas partes para distintos tipos de análisis.

Aproximadamente 0,1gr de hígado fueron depositados en un tubo Eppendorf (Imagen 7) y se preservaron en nitrógeno líquido. Para los análisis de estrés oxidativo, las muestras de tejido hepático se preservaron a -80°C en las instalaciones de la Universidad de las Islas Baleares.

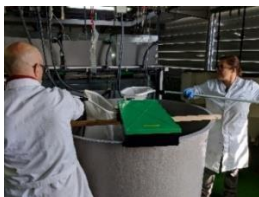


Imagen 4.



Imagen 5.



Imagen 6.



Imagen 7.

4.5 Aspectos éticos

El equilibrio de los daños a los animales con los beneficios para la sociedad suele ser a menudo la pregunta central en los experimentos con animales. El enfoque ético debe centrarse en buscar un trato justo y un total compromiso de todas las partes interesadas (Rodríguez Yunta, 2012). Y el uso de animales en investigación para beneficio humano impone al ser humano la responsabilidad moral de respetarlo, no haciéndoles sufrir innecesariamente al estar trabajando con seres vivos y sentientes. Este estudio cumple con la normativa bioética.

4.6 Control de calidad

Entre cada ejemplar, el material de trabajo se limpió debidamente y se desinfectó con alcohol. Tanto el material de disección como las superficies de trabajo debían de ser de metal para evitar contaminación cruzada. Además, el uso de guantes de nitrilo fue adecuado para realizar la disección.

4.7 Procesamiento de las muestras para la actividad enzimática (ROS)

Para analizar los efectos de la dieta enriquecida con plástico en el sistema antioxidante y detoxificante de *Sparus aurata*, se recolectaron muestras de hígado pertenecientes a 36 individuos, n=12 tratamiento Control (C), n=12 tratamiento Virgen (V), n=12 tratamiento Marinado (M).

Las muestras se homogeneizaron en 10 volúmenes (relación 1:10) de 100 mM Tris-HCl buffer pH=7,5 y los homogenados se centrifugaron a 9000xg durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se recolectaron para proceder con el análisis bioquímico.

Las actividades enzimáticas de la SOD, CAT, GST y MDA se determinaron sobre los sobrenadantes. El contenido total de proteínas se determinó en todas las muestras de hígado por un método colorimétrico (Biorad Protein Assay). Utilizando 190 μ l del reactivo de Bradford (Sigma) y 10 μ l de muestra (relación 1:20). A continuación, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó en el lector de microplaca a 595 nm. Así mismo, se efectuó un patrón de albúmina bovina sérica (BSA): 0,0.25,0.5,1.0,1.5 mg/ml de agua, como estándar para normalizar los resultados bioquímicos.

Todas las actividades enzimáticas se determinaron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100 a 25°C.

La actividad de la Superóxido dismutasa (SOD) (pkat/ mg proteína) se determinó a través del grado de inhibición de la reducción del citocromo C por el anión superóxido generado por la xantina oxidasa/ sistema hipoxantina (Alomar *et al.*, 2017; Sureda *et al.*, 2006). Para ello se utilizaron 50 μ l de Xantina oxidasa, 140 μ l de tampón fosfato potásico (50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,8), 0,0248 g Citocromo C y 10 μ l de muestra. A continuación, la actividad enzimática fue monitorizada a 25 °C a 550 nm, se recogieron los datos de la pendiente y los cálculos se basaron en el coeficiente de absorción $\epsilon = 28,1 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad de la Catalasa (CAT) (mk/ mg proteína; K= s⁻¹) se basó en la descomposición del H₂O₂. Para ello, se utilizó H₂O₂ 30 mM, 50 mM del tampón fosfato pH 7, depositando en la cubeta 2ml de tampón fosfato y 5 μ l de muestra, monitorizando el descenso a 25°C, 240 nm y registrando los datos de la pendiente. El cálculo de la actividad enzimática se realiza utilizando $\epsilon = 9,6 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para la actividad de la Glutatió Reductasa (GR), se utilizó tampón fosfato (200 Mm) empleándose 750 μ l, 1 mM, pH 7, 65.3 mM, NADPH 9.6 Mm. Empleándose 900 μ l de tampón, 10 μ l de muestra, 33,3 μ l de GSSG y 17 μ l de NADPH. La actividad se registró a 339 nm y se recogieron los datos respectivamente.

Para la actividad de la Glutación S-transferasa (GST) (uKat/ mg proteína) se utilizó glutación reducido (GSH) y 1-cloro-2,4-dinitrobencono (CDNB) como sustratos (Alomar *et al.*, 2017; Sureda *et al.*, 2006). Para ello, se emplearon 750 µl de tampón fosfato, 100 µl de GSH, 100 µl de muestra, 50 µl de CDBN. La lectura de la actividad enzimática se midió a 25° C a 340 nm. El cálculo de la actividad enzimática se realizó utilizando $\epsilon = 9,6 \text{ Mm}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$.

La actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx) se determinó con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y GSH como sustrato; GR y NADPH como indicadores enzimáticos y no enzimáticos respectivamente. Para ello, se emplearon 630 µl de tampón fosfato (200 mM, EDTA 1 Mm, pH 7), 20 µl de NaN₃, 50 µl NADPH, 100 µl GSH, 50 µl GR, 10 µl muestra y 100 µl H₂O₂. La actividad se midió a 339 nm, y se registraron los datos respectivamente.

Para la determinación de los niveles de MDA, como producto final de la descomposición oxidativa iniciada por las ROS sobre los ácidos grasos poliinsaturados (como biomarcador de la peroxidación lipídica), se analizó con un kit de ensayo colorimétrico para la determinación de MDA basado en la reacción del MDA con un reactivo cromogénico para producir un cromóforo estable con absorbancia máxima a 586 nm. Siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, Spain). A continuación, las muestras (0,1 ml) fueron depositadas en tubos de vidrio conteniendo 1-metil-2fenilindol (10.3 Mm), en acetonitrilo: metanol (3:1). Tras esto, se añadieron 0,075 ml de HCl (12N), y las muestras se incubaron por 1h a 45°C. A continuación, se dejaron enfriar y se recogieron 200 µl de sobrenadante por duplicado.

La absorbancia se midió a 586 nm y se registraron los datos. Los cálculos se realizan por medio de un patrón de MDA, a partir de una solución madre de 0,1 M. Los resultados se expresan en nmol MDA/mg proteína.

4.8 Análisis de los datos

Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el paquete estadístico (SPSS 25.0 para Windows®). Las diferencias significativas para la actividad enzimática del sistema antioxidante se determinaron utilizando ANOVA de una vía. Para determinar diferencias entre grupos, se utilizó el test post-hoc de Bonferroni.

Los resultados se expresan con las medias \pm desviación estándar obtenidas para cada biomarcador y se ha considerado $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las actividades enzimáticas (SOD, CAT, GPx, GR, GST) y MDA para los tratamientos (C, V, M) en el hígado de *Sparus aurata* (N=12; con gl=2). ANOVA de una vía. (*) Indica diferencias significativas entre tratamientos para un mismo biomarcador, $p < 0,05$.

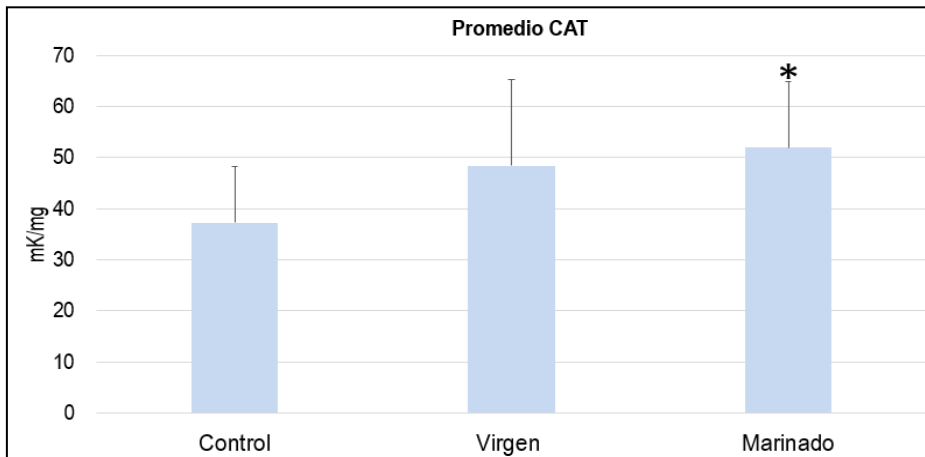


Figura 1. Representación de los valores medios (mK/mg) obtenidos para la actividad enzimática de la Catalasa (CAT) en cada uno de los tratamientos (Control, Virgen y Marinado). Las barras de error indican la desviación estándar. (*) Indica diferencias significativas entre los tratamientos Control y Marinado, $p < 0,05$.

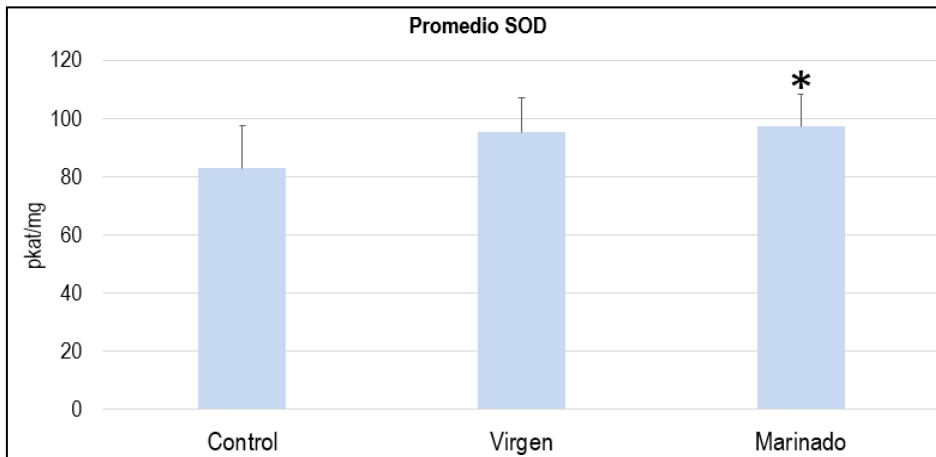


Figura 2. Representación de los valores medios (pkat/mg) obtenidos para la actividad enzimática de la Superóxido dismutasa (SOD), en cada uno de los tratamientos (Control, Virgen y Marinado). Las barras de error indican la desviación estándar. (*) Indica diferencias significativas entre los tratamientos Control y Marinado, $p < 0,05$.

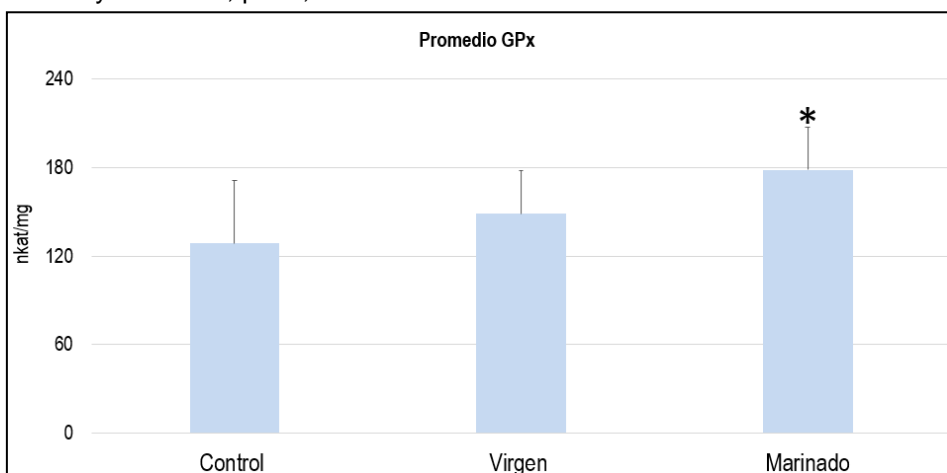


Figura 3. Representación de los valores medios (nkat/mg) obtenidos para la actividad enzimática de Glutación Peroxidasa (GPx), en cada uno de los tratamientos (Control, Virgen y Marinado). Las barras de error indican la desviación estándar. (*) Indica diferencias significativas entre los tratamientos Control y Marinado, $p < 0,05$.

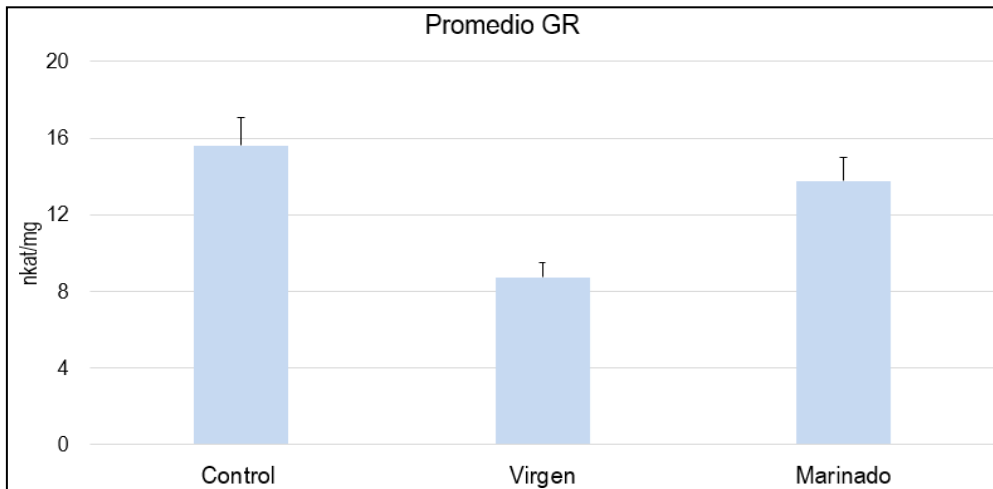


Figura 4. Representación de los valores medios (nkat/mg) obtenidos para la actividad enzimática de Glutación Reductasa (GR), en cada uno de los tratamientos (Control, Virgen y Marinado). Las barras de error indican la desviación estándar.

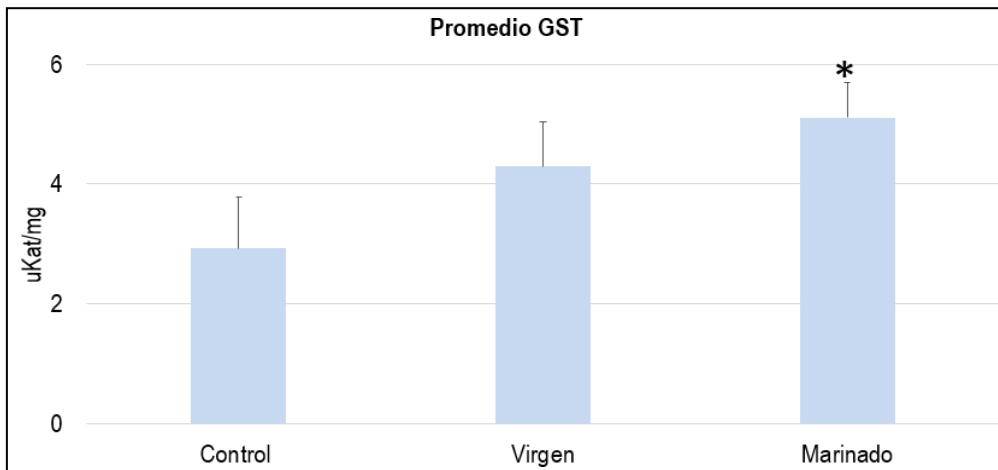


Figura 5. Representación de los valores medios (uKat/mg) obtenidos para la actividad enzimática de Glutación S-Transferasa (GST), en cada uno de los tratamientos (Control, Virgen y Marinado). Las barras de error indican la desviación estándar. (*) Indica diferencias significativas entre los tratamientos Control y Marinado, $p < 0,05$.

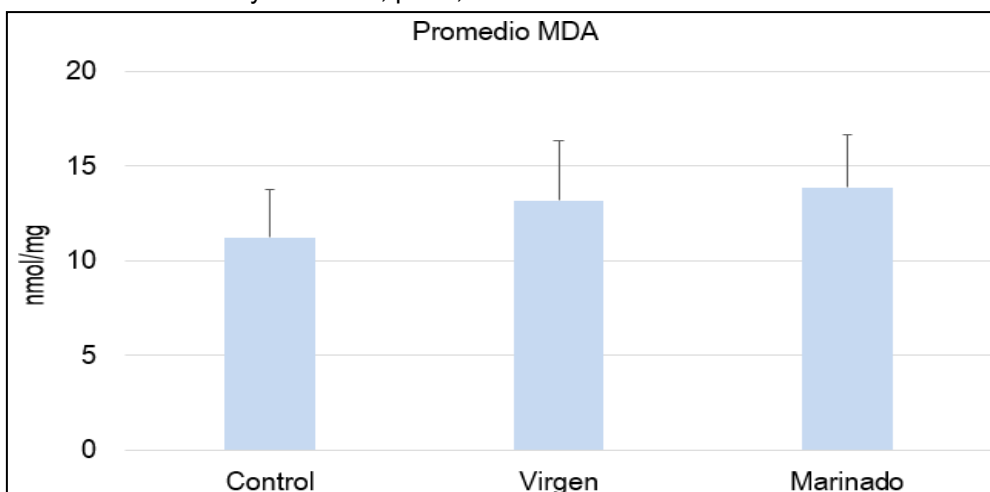


Figura 6. Representación de los valores medios (nmol/mg) obtenidos de Malondialdehído (nmol/mg), (producto final de la peroxidación lipídica), obtenidas para en cada uno de los tratamientos (Control, Virgen y Marinado). Las barras de error indican la desviación estándar. (*) Indica diferencias significativas entre los tratamientos Control y Marinado, $p < 0,05$.

La mayoría de biomarcadores utilizados en *S. aurata* (SOD, CAT, GPx, GST), presentan diferencias significativas para el tratamiento marinado (M) ($p < 0,05$), teniendo valores superiores en comparación con los otros tratamientos virgen (V) y control (C).

En concreto, los valores medios obtenidos para la actividad de la CAT son superiores para el tratamiento M (51.9) con respecto del C (37.2), habiendo diferencias significativas para el tratamiento M ($p < 0,05$). De forma similar, la actividad de la SOD presenta valores medios superiores para el tratamiento M (97.2) con respecto del tratamiento C (82.8), habiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos C y M.

En referencia a la actividad enzimática de la GPx, presenta valores medios superiores para el tratamiento M (178.5) en comparación con el tratamiento control C (128.7), habiendo diferencias significativas entre los tratamientos C y M ($p < 0,05$) para este enzima. Sin embargo, y a diferencia de los valores obtenidos para CAT, SOD y GPx; la actividad de la GR no presenta valores superiores para el tratamiento M (13.7) con respecto del C (15.6), y no presenta diferencias significativas para los diferentes tratamientos (C, V, M).

Con respecto de la actividad de la GST, presenta valores superiores para el tratamiento M (5.1) en comparación con el tratamiento C (2.9), de forma similar a la CAT, SOD y GPx. Y se establecen diferencias significativas ($p < 0,05$) para los tres tratamientos (C, V, M) respectivamente.

Por último, la medición de los niveles de MDA, para evaluar el estado de la peroxidación lipídica en el hígado de *S. aurata* para los diferentes tratamientos (C, V, M); no presenta diferencias significativas. Y los valores medios obtenidos son similares entre los tratamientos V (13.16) y M (13.86).

6. DISCUSIÓN

La translocación de los microplásticos al hígado en varias especies de peces es un hecho, que ya ha sido observado (Jovanović *et al.*, 2018). Y el estrés oxidativo está relacionado con la formación de ROS, que se generan continuamente de forma endógena como resultado de un metabolismo normal. Además, las ROS pueden generarse como subproductos de la biotransformación de toxinas o xenobióticos. Por lo que el estado antioxidante celular se ha utilizado para evaluar la habilidad de los organismos para resistir el estrés ambiental a algunos contaminantes marinos (Sureda *et al.*, 2006).

En primer lugar, la peroxidación lipídica es una reacción en cadena autosostenible de eventos moleculares que da como resultado un daño oxidativo en las membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos. La peroxidación de los lípidos de membrana altera la estructura y función de la bicapa lipídica, cambia la permeabilidad y promueve la penetración de agentes tóxicos en las células. De hecho, los organismos expuestos a xenobióticos usualmente demuestran peroxidación lipídica. Por lo que la medición del MDA como producto de la peroxidación lipídica es un biomarcador de exposición a contaminantes ambientales ampliamente utilizado (Prokić *et al.*, 2019).

No obstante, en este estudio en particular, no se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos (C=11.23, V=13.16, M=11.23) para las mediciones obtenidas de MDA. Del mismo modo, en el estudio de Alomar *et al.*, (2017); no se encontraron diferencias significativas para los niveles de MDA hepáticos en *M. surmuletus* expuestos a una dieta con microplásticos, cuyos valores medios (13.18); se aproximan a los obtenidos en este estudio.

De forma similar a este estudio, tampoco se encontró peroxidación lipídica en peces o animales inyectados con una mezcla de PCBs en el estudio llevado a cabo por Pedrajas *et al.*, (1995). Asimismo, el estudio de Oliveira *et al.*, (2013) reporta la ausencia de efectos en lo que respecta a la peroxidación

lipídica en el gobio común (*Pomatoschistus microps*) expuesto (96 h) a una mezcla de microplásticos y pireno.

Además, Prokić *et al.*, (2019) indica que a pesar de que la determinación de MDA es uno de los métodos de detección más comunes, es insuficiente y puede estar alterado por la interferencia de especies relacionadas o la sobreestimación, debido a las condiciones del análisis bajo condiciones de estrés específicas. Por lo que, uno de los problemas de los estudios, es la sensibilidad de los métodos utilizados para la determinación de la peroxidación lipídica. Una solución puede ser, el uso de más mediciones para examinar el daño de biomoléculas (proteínas o DNA) en comparación con la peroxidación lipídica.

Otra de las actividades enzimáticas que no ha presentado diferencias significativas para los tratamientos (C, V, M) es la GR, esta forma reducida del glutatión, tiene un papel importante en la eliminación de oxirradicales y se encuentra involucrado en el metabolismo de compuestos tóxicos y sustancias endógenas. De hecho, cataliza la reducción de GSSG a GSH en una reacción NADPH-dependiente, de esta manera protege las células contra el daño oxidativo (Magara *et al.*, 2018). En este estudio, la GR presenta un menor grado de actividad en comparación con la enzima GPx.

Tanto la GPx como la GST participan en la detoxificación de hidroperóxidos lipídicos mediante el uso de GSH, y como consecuencia pueden reducir el "pool" celular de GSH. De hecho, la GST en particular, necesita GSH como sustrato, el cuál es oxidado a GSSG. Y en el hígado animal, la GST produce un glutatión conjugado que parece ser el primer paso en la detoxificación de diferentes toxinas (Sureda *et al.*, 2006). En este estudio, la GST presenta diferencias significativas para todos los tratamientos, habiendo un incremento de la actividad de este enzima para el tratamiento M con respecto del V y C. Esto indica el papel efectivo del hígado y en concreto, de la propia GST en la detoxificación y excreción de xenobióticos (Monteiro *et al.*, 2006). Del mismo modo, en el estudio de la ingesta de microplásticos en *M. surmuletus* llevado a cabo por Alomar *et al.*, (2017) demuestra un incremento ligero en la actividad de GST, probablemente reflejando la inducción del sistema de detoxificación.

Además, teniendo en cuenta que el tratamiento M consistió en microplásticos de polietileno de baja densidad (LDPE) que estuvieron en contacto con los contaminantes del ambiente marino del Puerto de Andratx por dos meses; el incremento de la actividad GST para el tratamiento M en *S. aurata* refuerza también la hipótesis sobre la posible función de los microplásticos como vectores de contaminantes del medio, demostrada previamente por Rochman *et al.*, (2013) en uno de sus estudios. Y por consiguiente, indica la capacidad del polietileno para absorber contaminantes orgánicos como Frias *et al.*, (2010) indica en su estudio.

Dados los efectos inhibidores sobre la formación de ROS, el sistema SOD-CAT proporciona la primera línea de defensa en contra de la toxicidad del oxígeno. Por lo que es habitualmente utilizado como un biomarcador de indicación de la producción de ROS (Monteiro *et al.*, 2006). Con respecto de los valores obtenidos para las actividades enzimáticas de la SOD, CAT y GPx; se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos M y C, presentando valores medios superiores en sus actividades para el tratamiento M. De forma similar, el estudio de Alomar *et al.*, 2017 presenta valores superiores para las actividades enzimáticas SOD y CAT en *M. surmuletus* expuestos a una dieta con microplásticos en comparación con los valores obtenidos para los individuos expuestos a una dieta sin microplásticos. Notándose el incremento en la actividad entre los diferentes tratamientos.

Teniendo en cuenta que las funciones de las enzimas SOD, CAT y GPx están relacionadas. Puesto que la SOD cataliza la dismutación del anión radical superóxido a H₂O y H₂O₂, siendo detoxificados por la CAT y la GPx; según Monteiro *et al.*, (2006), el incremento de estas actividades enzimáticas es probablemente la respuesta a un incremento de la generación de ROS inducida por la exposición a ciertos xenobióticos como los pesticidas. Dado que, los contaminantes ambientales pueden incrementar la actividad de la GPx; siendo esto, otro indicio de la capacidad de los microplásticos tipo LDPE del tratamiento M para absorber contaminantes del ambiente, además de indicar su capacidad

como vectores para la bioacumulación de contaminantes en peces. Así mismo, el incremento de los niveles de SOD y CAT observados para el tratamiento M con respecto del C y V, es indicativo de un estado antioxidante elevado que intenta neutralizar el impacto de las ROS (Monteiro *et al.*, 2006).

Sin embargo, y como se ha expuesto anteriormente, no todos los biomarcadores de estrés oxidativo utilizados para este estudio han presentado diferencias significativas entre los tratamientos C y M (MDA, GR). Pudiendo ser debido a la posibilidad de que el sistema celular antioxidante haya demostrado una gran adaptación al estrés oxidativo a la hora de contrarrestar la excesiva producción de ROS (Sureda *et al.*, 2006).

A pesar de que varios estudios hayan observado aumentos en las actividades de enzimas antioxidantes con exposición (en condiciones de laboratorio) a una variedad de contaminantes orgánicos y metálicos, las respuestas son transitorias y variables para diferentes especies, enzimas y contaminantes simples o mixtos. Observándose aún mayor variabilidad en estudios de campo con mayor, sin variación, o menor actividad para las diferentes enzimas antioxidantes, para organismos acuáticos contaminados en comparación con organismos acuáticos exentos de contaminación (Livingstone, 2001).

Por otro lado, la variabilidad de los resultados de estos estudios puede deberse al tipo de especie utilizada, el tiempo de exposición y tipo o tamaño de los microplásticos (Alomar *et al.*, 2017). Además, muchos de los trabajos publicados son principalmente descriptivos, y necesitan la comprensión básica de los principios y generación o eliminación de ROS. Esto podría abrir puertas para controlar el proceso y evitar las consecuencias negativas derivadas del estrés oxidativo (Lushchak, 2011).

Por consiguiente, es necesario tener en cuenta que las respuestas biológicas de los animales expuestos al ambiente a menudo son apenas interpretables, debido a la alta complejidad de los contaminantes. Y también, porque la exposición crónica a bajos niveles de contaminantes puede conducir a mecanismos fisiológicos de adaptación que reducen la sensibilidad de los animales a los contaminantes (Sureda *et al.*, 2006).

En definitiva, este estudio aporta evidencia del incremento del estrés hepático para los ejemplares de *S. aurata* expuestos a una dieta enriquecida con microplásticos. Teniendo un mayor efecto para los individuos expuestos a una dieta con microplásticos marinados (tipo LDPE) que han estado en contacto con los contaminantes del ambiente marino. Por lo que estos resultados refuerzan la hipótesis planteada por algunos autores como Rochman *et al.*, (2013) sobre la influencia de los microplásticos como posibles vectores para la bioacumulación de agentes xenobióticos procedentes del ambiente en los organismos; cuyo consenso según Magara *et al.*, (2018) sigue siendo eludible. Por lo que, las evaluaciones futuras con respecto a los peligros asociados al plástico en los hábitats acuáticos, deben priorizar las investigaciones en aquellos plásticos que puedan absorber mayores concentraciones de contaminantes químicos (como el polietileno), la concentración y tipo de contaminantes absorbidos del ambiente (Rochman *et al.*, 2013), el grado de bioacumulación de estos en los organismos y la capacidad de ser detoxificados.

Por último, es necesario destacar que estos resultados son una pequeña y breve aportación del proyecto ACUIPLASTIC ya que, paralelamente a este estudio, se están llevando a cabo otras investigaciones (análisis bioquímicos, histopatológicos, fisiológicos entre otros) que aportarán mayor claridad e información sobre el impacto de los microplásticos en *Sparus aurata*.

Finalmente, dado que las predicciones para el año 2025 indican que la cantidad de plástico desechado pueda superar las 220 millones de toneladas anuales, incrementando por tanto, la oportunidad de exposición a una gran variedad de organismos (Rochman *et al.*, 2013). Existe una necesidad urgente para la realización de un mayor número de investigaciones científicas que impliquen estudios en condiciones de campo y de laboratorio que mimeticen las complejas condiciones del ambiente marino. Y de este modo, poder aumentar el conocimiento relacionado con los riesgos ecológicos y biológicos

derivados de la ingesta de microplásticos; con el fin de poder aportar evidencias que motiven la implementación de todas las medidas legislativas que se consideren oportunas para poder garantizar la protección del medio ambiente; antes de que sea demasiado tarde.

7. OBSERVACIONES FINALES

-Los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en los individuos de *Sparus aurata* expuestos a una dieta enriquecida con microplásticos, presentan diferencias significativas para el tratamiento marinado con microplásticos tipo LDPE.

-La mayor actividad de los enzimas de estrés oxidativo en los individuos de *Sparus aurata* expuestos al tratamiento marinado con microplásticos tipo LDPE, sugiere la capacidad de los microplásticos como vectores para la bioacumulación de contaminantes ambientales en los organismos.

8. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Centro Oceanográfico de Baleares (COB) por ofrecer sus instalaciones del laboratorio de LIMIA (Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuicultura) y equipamiento para el desarrollo del presente trabajo. Gracias a mi tutora, Salud Deudero, por darme la oportunidad de poder formar parte del proyecto de investigación ACUIPLASTIC con número de referencia CTM2017-88332-R; a Antoni Sureda por su dedicación en la supervisión del trabajo y por ofrecer las instalaciones y el equipamiento del laboratorio de la Universitat de les Illes Balears, a Carme Alomar, Montserrat Compa y Elvira Álvarez por toda la ayuda ofrecida. Por último, me gustaría agradecer a mis padres por su apoyo incondicional.

9. REFERENCIAS

- Alimi O S, Farner Budarz, J Hernandez, L M & Tufenkji N.** 2018. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environmental Science and Technology* 52, no 4: 1704–1724.
- Alomar C & Deudero S.** 2017. Evidence of microplastic ingestion in the shark *Galeus melastomus* Rafinesque, 1810 in the continental shelf off the western Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* 223: 223–229.
- Alomar C, Estarellas F & Deudero S.** 2016. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. *Marine Environmental Research* 115: 1–10.
- Alomar C, Sureda A, Capó X, Guijarro B, Tejada S & Deudero S.** 2017. Microplastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. *Environmental Research*, 159: 135–142.
- Andrady A L.** 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 62, no 8: 1596–1605.
- Arukwe A & Goksøyr A.** 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia* 83, no 3: 224–241.
- Bosi G, DePasquale J A, Manera M, Castaldelli G, Giari L & Sayyaf Dezfuli B.** 2018. Histochemical and immunohistochemical characterization of rodlet cells in the intestine of two teleosts, *Anguilla anguilla* and *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Diseases* 41, no 3: 475–485.

- Cole M, Lindeque P, Halsband C, & Galloway TS.** 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* 62, no12: 2588-2597.
- Colloca F & Cerasi S.** FAO - Sparus aurata. In Cultured aquatic species fact sheets. 2009. Recupeado de:http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_giltheadseabr.htm
- Compa M & Deudero S.** 2018. *Abundance and spatial distribution of coastal floating plastic marine debris in the Balearic Islands.* Universitat de les Illes Balears.
- Endo S, Takizawa R, Okuda K, Takada H, Chiba K, Kanehiro H.** 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: Variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin* 50, no 10: 1103–1114.
- Frias, JPGL, Sobral P & Ferreira AM.** 2010. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin* 60, no 11: 1988–1992.
- Galgani F, Leaute J P, Moguedet P, Souplet A, Verin Y, Carpentier A, Nerisson P.** 2000. Litter on the sea floor along European coasts. *Marine Pollution Bulletin* 40, no 6: 516–527.
- Gewert B, Plassmann M M, Macleod M.** 2015. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 17, no 9: 1513–1521.
- Halliwell B & Gutteridge J M C.** 1991. Free radicals in biology and medicine, second edition. *Free Radical Biology and Medicine* 10, no 6: 449–450.
- Hann S, Sherrington C, Jamieson O, Hickman M, Kershaw P & Bapasola A.** 2018. *Investigating options for reducing releases in the aquatic environment of microplastics emitted by (but not intentionally added in) products Final Report.*
- Hugla J L & Thomé J P.** 1999. Effects of polychlorinated biphenyls on liver ultrastructure, hepatic monooxygenases, and reproductive success in the barbel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 42, no 3: 265–273.
- Ji L L, Gomez-Cabrera M C & Vina J.** 2006. Exercise and hormesis: Activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067, no:1, 425–435.
- Jovanović B, Gökdağ K, Güven O, Emre Y, Whitley E M & Kideys A E.** 2018. Virgin microplastics are not causing imminent harm to fish after dietary exposure. *Marine Pollution Bulletin* 130, 123–131.
- Karami A, Romano N, Galloway T & Hamzah H.** 2016. Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental Research* 151, 58–70.
- Koelmans A A, Bakir A, Burton A & Janssen C R.** 2016. Microplastic as a Vector for CHemicals in the Aquatic Environment. Critical Review and Mocal-Supported Re-interpretation of Empirical Studies. Supporting Information, 1–6.
- Livingstone D R.** 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, no 8: 656–666.
- Lushchak V I.** 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*.

- Lusher A.** 2015. Microplastics in the marine environment: Distribution, interactions and effects. In *Marine Anthropogenic Litter*. 245–307. Cham: Springer International Publishing.
- Magara G, Elia A C, Syberg K & Khan FR.** 2018. Single contaminant and combined exposures of polyethylene microplastics and fluoranthene: accumulation and oxidative stress response in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 81, no 16: 761–773.
- Manera M & Dezfuli B S.** 2004. Rodlet cells in teleosts: A new insight into their nature and functions. *Journal of Fish Biology* 65, no 3: 597–619.
- Mato Y, Isobe T, Takada H, Kanehiro H, Ohtake C & Kaminuma T.** 2001. Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. *Environmental Science & Technology* 35, no 2: 318–324.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 2016. Memoria anual de generación y gestión de residuos. Recuperado de https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/2019tabladatosenvasesyresiduosdeenvases2017_tcm30-498744.pdf
- Monteiro D A, de Almeida J A, Rantin F T & Kalinin A L.** 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 143, no 2: 141–149.
- Oliveira F, Monteiro P, Bentes L, Henriques N S, Aguilar R & Gonçalves J M S.** 2015. Marine litter in the upper São Vicente submarine canyon (SW Portugal): Abundance, distribution, composition and fauna interactions. *Marine Pollution Bulletin*, 97 no:1–2, 401–407.
- Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K & Guilhermino L.** 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators* 34, 641–647.
- Pedà C, Caccamo L, Fossi M C, Gai F, Andaloro F, Genovese L, Maricchiolo G.** 2016. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution* 212, 251–256.
- Pedrajas J R, Peinado J & López-Barea J.** 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico-Biological Interactions* 98, no3: 267–282.
- PESCA Y ACUICULTURA EN EUROPA. 2012. Recuperado de: https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/sea-bream_es.pdf
- Plastics - the Facts 2018. An analysis of Europe plastics production, demand and waste data. Brussels-Belgium: Plastics Europe.
- Prokić M D, Radovanović T B, Gavrić J P & Faggio C.** 2019. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 111, 37–46.
- Rochman C M, Hoh E, Kurobe T & Teh S J.** 2013. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports* 3, 1–7.

- Rochman C M, Kurobe T, Flores I & Teh S J.** 2014. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of The Total Environment* 493, 656–661.
- Rombout J H W M, Lamers C H J, Helfrich M H, Dekker A & Taverne-Thiele J J.** 1985. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell and Tissue Research* 239, no 3: 519–530.
- SAM. 'Microplastic Pollution: The Policy Context - Background Paper', The Scientific Advice Mechanism Unit of the European Commission. 2018.
- Sonnenschein C & Soto A M.** 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65, no:1–6, 143–150.
- Sureda A, Box A, Enseñat M, Alou E, Tauler P, Deudero S & Pons A.** 2006. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpenyne. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 144, no 2: 191–196.
- Sureda A, Capó X, Busquets-Cortés C & Tejada S.** 2018. Acute exposure to sunscreen containing titanium induces an adaptive response and oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 58–63.
- Teuten E L, Saquing J M, Knappe D R U, Barlaz M A, Jonsson S, Björn A, Takada H.** 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, no 526: 2027–2045.
- Thompson R C.** 2007. Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions. In *Marine Nature Conservation in Europe 2006*. 107–116. Plymouth, UK.
- Turyk M E, Persky V W, Imm P, Knobeloch L, Chatterton R & Anderson H A.** 2008. Hormone disruption by PBDEs in adult male sport fish consumers. *Environmental Health Perspectives*, 116, no: 12.
- UNEP, GEF, & Convention on Biological Diversity. 2012. *Secretariat of the Convention on Biological Diversity Impacts of marine Debris on Biodiversity*.
- Wang F, Wong C S, Chen D, Lu X, Wang F & Zeng E Y.** 2018. Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review. *Water Research* 139, 208–219.