



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

TRABAJO FIN DE GRADO

Evaluación de la toxicidad de metilparabeno en *Artemia franciscana*: efectos sobre crecimiento, supervivencia y biomarcadores.

Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir

Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales

Grado en Ciencias del Mar

Promoción 2011/2015

AUTOR: María Martín Villamil

DIRECTORES: Inma Varó Vaello y Javier Torres Gavilá

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Universidad Católica de Valencia y al Instituto de Acuicultura “Torre de la Sal” (IATS) del CSIC en Castellón por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar allí las prácticas, y a las personas conocidas durante mi estancia en Castellón, que me acogieron desde el primer momento, haciendo de estos meses una experiencia más que agradable.

Agradecer a mi familia, por aguantarme a pesar de todo y apoyarme desde el primer momento, y en especial a mi madre, por saber siempre qué decir para animarme y relajarme, y porque sólo se necesita una llamada de teléfono para acabar con los problemas. No sé qué hubiera sido de mí esta temporada sin ellos.

Gracias a Carolina por estar siempre dispuesta a ayudar, por ser tan buena persona como lo es de docente y por actuar muchas veces además de profesora, de nuestra “mami”; y gracias también a Germán por ser un excelentísimo profesor y por haber puesto su granito de arena en este proyecto, ayudándome a entender un poquito mejor el complejo mundo de la estadística.

Por último, gracias a mis tutores Javier Torres por lo exigente, atento y en definitiva, por lo buen profesional que es y ha demostrado ser; e Inma Varó, por haberme enseñado tantísimo en tan solo tres meses y por dedicarme su tiempo y sus consejos. Destacar lo gran persona y profesional que es, además de su fuerza y enorme paciencia conmigo, por todos esos “problemillas” y quebraderos de cabeza que he causado. Me dejo otra “mami” en Castellón.

No podía haber tenido más suerte con la resolución de tutores.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Introducción	5
2.1. Parabenos.....	5
2.2. <i>Artemia</i> como modelo en estudios de ecotoxicología	10
2.3. Biomarcadores	14
2.4. Objetivos.....	16
3. Materiales y métodos.....	17
3.1. Organismos	17
3.2. Compuesto químico.....	17
3.3. Test de toxicidad aguda: determinación de LC ₅₀	18
3.4. Ensayo de toxicidad crónica	19
3.4.1. Preparación de las muestras	21
3.4.2. Supervivencia y crecimiento	21
3.4.3. Determinación de biomarcadores.....	23
3.4.3.1. Colinesterasa	23
3.4.3.2. Glutación-S-transferasa	24
3.4.3.3. <i>Ratio</i> RNA/DNA.....	25
3.4.3.4. Proteína total.....	26
3.5. Análisis estadístico	28
4. Resultados.....	29
4.1. Test de toxicidad aguda. LC ₅₀	29
4.2. Supervivencia y crecimiento	29
4.2.1. Supervivencia.....	29
4.2.2. Crecimiento	30
4.3. Biomarcadores	32
4.3.1. Colinesterasa	32
4.3.2. Glutación-S-transferasa	35
4.3.3. <i>Ratio</i> RNA/DNA.....	37
5. Discusión	38
6. Conclusiones.....	43
7. Bibliografía.....	44

1. RESUMEN

En la actualidad se utiliza a diario gran cantidad de productos con parabenos en su composición. Debido a su uso masivo, cada vez se detectan mayores cantidades de parabenos en medios acuáticos. En este estudio se analiza la toxicidad de un contaminante emergente, como es el metilparabeno, en *Artemia franciscana*, dada la presencia de este compuesto en zonas costeras y salinas mediterráneas.

Para ello, se realizó un diseño experimental para determinar la toxicidad aguda (LC_{50}), así como el efecto crónico tras la exposición a dos concentraciones subletales (0.05 y 0.1 ppm) durante 9 días, sobre diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos, tales como la supervivencia, crecimiento, actividad de las enzimas colinesterasa y glutatión-S-transferasa y *ratio* de RNA/DNA.

Los nauplios de *A. franciscana* son poco sensibles al MeP, (LC_{50} -24 h de 131.4 ppm). El metilparabeno afecta significativamente a la supervivencia y crecimiento en exposiciones crónicas a las concentraciones subletales ensayadas (0.05 y 0.1 ppm). Además, éstas causan alteraciones significativas de la actividad colinesterasa, mientras que no se observa ningún efecto sobre la actividad glutatión-S-transferasa y la *ratio* RNA/DNA.

Estos resultados indican que *A. franciscana* es resistente al metilparabeno, aunque exposiciones crónicas (hasta 9 días) a concentraciones subletales sí producen alteraciones en supervivencia y crecimiento. Además, la actividad colinesterasa es un biomarcador sensible a este compuesto mientras que la actividad glutatión-S-transferasa y la *ratio* RNA/DNA no presentan alteraciones.

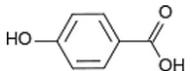
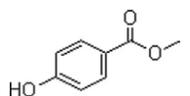
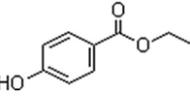
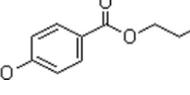
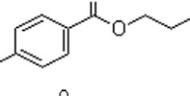
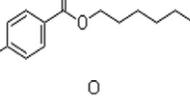
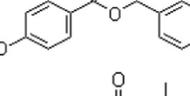
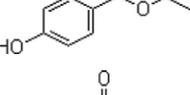
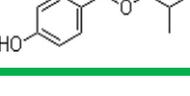
2. INTRODUCCIÓN

2.1. Parabenos

Los parabenos (PB) son ésteres del ácido hidroxibenzoico (*p*-AHB) que se comenzaron a usar a mediados de 1920 como conservantes antimicrobianos en productos farmacéuticos (Soni *et al.*, 2005) y pronto expandieron sus utilidades hasta la industria cosmética y la alimentación (Guo y Kannan, 2013). Son compuestos con un anillo de benceno, un grupo hidroxilo y un grupo éster en la posición *para* del anillo. Estas sustancias difieren en la longitud de la cadena del grupo alquilo, diferenciándose así dos categorías: los parabenos de cadena corta (metilparabeno y etilparabeno) y los de cadena larga (propilparabeno, isopropilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno y bencilparabeno) (Soni *et al.*, 2005; Haman *et al.*, 2015). Éstos pueden ser producidos sintéticamente, por esterificación del *p*-AHB con un alcohol y en presencia de un catalizador, o por ciertos organismos como bacterias y plantas (Bledzka *et al.*, 2014).

Las características físicas y químicas de los principales PB usados actualmente se recogen en la tabla 1. Estos compuestos son moderadamente solubles en agua (desde 160 mg·L⁻¹ para el benzilparabeno (BzP) hasta 2500 mg·L⁻¹ para el metilparabeno (MeP) a 25 °C), disminuyendo ésta con el aumento de la longitud de la cadena, al igual que el coeficiente de partición octanol-agua (log K_{ow}). Por el contrario, la constante de disociación ácida *p*K_a (de 8.17 MeP a 8.50 BzP) y la toxicidad de la sustancia aumentan conforme aumenta la longitud de la cadena del éster. Los PB no son muy volátiles y su punto de ebullición es relativamente alto (Haman *et al.*, 2015).

Tabla 1. Fórmula y estructura química de los principales parabenos usados actualmente y su metabolito (*p*-AHB), así como las características físicas y químicas de algunos de ellos. Tabla tomada de Haman *et al.* (2015).

Nombre químico	Fórmula	Peso molecular (g·mol ⁻¹)	Punto de fusión	Punto de ebullición	Presión de vapor a 25 °C	Solubilidad en agua a 25 °C	Coefficiente de reparto octanol-agua (log K _{ow})	Constante de disociación ácida (pK _a)	Estructura química
<i>p</i>-ácido hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	214.5	298.03	-	5000	1.58	2.7	
Metilparabeno	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	131	275	0.114	2500	1.96	8.17	
Etilparabeno	C ₉ H ₁₀ O ₃	254.38	117	297.5	0.01239	885	2.47	8.22	
Propilparabeno	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180.21	97	285.14	0.04093	500	3.04	8.35	
Butilparabeno	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.23	68.5	300.26	0.0334	207	3.57	8.37	
Heptilparabeno	C ₁₄ H ₂₀ O ₃								
Benzilparabeno	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.24	110	-	-	160	3.27	8.50	
Isopropilparabeno	C ₁₀ H ₁₂ O ₃								
Isobutilparabeno	C ₁₁ H ₁₄ O ₃								

Los parabenos son considerados conservantes ideales porque tienen un amplio espectro de actividad anti-microbiana, principalmente en bacterias Gram-positivas, levaduras y moho, mientras que tienen poco efecto sobre las esporas bacterianas, y ninguno sobre virus, micobacterias y priones (Haman *et al.*, 2015). Además, son altamente estables en lo que se refiere a la variación en el pH, relativamente seguros de utilizar y tienen bajos costes de producción (Soni *et al.*, 2005; Błędzka *et al.*, 2014). Sin embargo, ciertos estudios (Lee *et al.*, 2005; Boberg *et al.*, 2010; Kusk *et al.*, 2011) sugieren que tienen cierto papel como disruptores endocrinos, con actividades estrogénicas, y que existe relación entre la exposición a parabenos y el desarrollo de cáncer en humanos, aunque los resultados sobre los riesgos derivados de la utilización de estos compuestos no son concluyentes todavía. Diversos estudios realizados en orina (Wang *et al.*, 2013; Moos *et al.*, 2014) han demostrado que el ser humano está expuesto a los parabenos por diferentes vías siendo la principal, la industria cosmética (Soni *et al.*, 2005; Błędzka *et al.*, 2014) y el parabeno predominante, el MeP (Wang *et al.*, 2013; Moos *et al.*, 2014).

Los parabenos se utilizan principalmente como conservante en cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos. Sin embargo, también se pueden usar en productos de consumo industriales como cigarrillos, barnices y pegamento... (Soni *et al.*, 2005). Además, recientemente se han encontrado PB en multitud de productos de papel, tales como billetes, periódicos, y en especial, en toallitas sanitarias antimicrobianas, siendo el MeP el éster predominante en estos productos (Neves *et al.*, 2009; Liao y Kannan, 2014).

En los productos farmacéuticos, el contenido máximo de PB raramente excede el 1% (Soni *et al.*, 2005). Éstos se usan como excipientes en dichos productos para evitar la contaminación microbiana y prevenir la degradación del ingrediente activo (Soni *et al.*, 2005). Concretamente, el MeP también se utiliza como un plastificante para este tipo de productos, y facilita ciertas etapas en la producción de medicamentos.

En alimentación, la concentración máxima permitida es del 0.1%. El uso de PB como aditivos alimentarios está autorizado en la Unión Europea mediante el Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.

En cuanto a la industria cosmética, los PB son utilizados como compuestos en más de 22000 cosméticos, estimándose que el uso diario de productos cosméticos que los contienen es de 17.76 g por adulto y 378 mg por niño (Andersen, 2008). El

reglamento (UE) N° 1004/2014 de la comisión de 18 de septiembre de 2014 por el que se modifica el anexo V del Reglamento (CE) n° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los productos cosméticos, permite para el *p*-AHB, sus sales y sus ésteres, una concentración máxima del 0.4% en el caso de tratarse de un solo éster y del 0.8% para las mezclas de éstos, excepto en el caso del butilparabeno, el propilparabeno y sus sales, cuyas concentraciones máximas son del 0.14% para concentraciones individuales, y del 0.8% para la mezcla de todas las sustancias mencionadas, siempre y cuando estas últimas no excedan el 0.14% del total y jamás se utilizarán en niños menores de 3 años, especialmente en “la zona del pañal”, por su potencial actividad endocrina.

Actualmente no hay regulaciones con respecto a la presencia de parabenos en el medio ambiente, particularmente, en el medio acuático y en aguas residuales (Haman *et al.*, 2015). Sin embargo, el MeP es una de las sustancias controladas por el reglamento REACH, mientras que los demás parabenos en la actualidad sólo se registran en la lista de candidatos REACH (DEPA, 2013).

El uso masivo de productos que contienen parabenos, genera unos residuos ricos en estas sustancias. Numerosos estudios (Kusk *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2012; Teerlink *et al.*, 2012) han demostrado que diferentes tipos de descargas residuales (doméstica, industrial o de hospitales), contienen diferentes concentraciones de parabenos, siendo superiores en zonas costeras o ríos, cerca de fábricas de productos con estos componentes (Jonkers *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2012). Las descargas de dichas fábricas y hospitales, así como de las plantas de tratamientos de efluentes residuales, constituyen la fuente directa de contaminación acuática ambiental debida a PB. Del mismo modo, se encuentran diferencias de concentraciones en el medio según el número de habitantes de la población de donde procede la descarga (Jonkers *et al.*, 2010).

Aunque encontramos PB en el aire, en suspensión, y en suelos (Bledzka *et al.*, 2014), predominan en la fase acuosa (> 97%), debido a su moderada solubilidad en agua (Bratkowska *et al.*, 2011). Si los parabenos se liberan al medio acuático, su adsorción a sólidos o sedimentos en suspensión depende en gran medida del contenido orgánico de la materia sólida presente y la hidrofobicidad de los parabenos (es decir, $\log K_{ow}$), lo que sugiere que las interacciones hidrofóbicas predominan en comparación con otros tipos de reacción (Yamamoto *et al.*, 2007; DEPA, 2013; Liao *et al.*, 2013). En España se han llegado a detectar pequeñas concentraciones de MeP incluso en agua de grifo (Blanco *et al.*, 2009; Casas *et al.*, 2011; Carmona *et al.*, 2014)

y agua embotellada (Carmona *et al.*, 2014). Sin embargo, si dicha agua se somete a tratamientos con cloro u ozono, las concentraciones disminuyen extremadamente o incluso desaparecen (Haman *et al.*, 2015), aunque se necesitan más investigaciones para confirmar este hecho.

Todos los estudios realizados sobre tratamiento de aguas residuales con PB muestran que, sea cual sea el proceso implementado en las plantas depuradoras, la eficiencia de eliminación de esta clase de compuestos es mayor del 90%, lo que reduce significativamente las concentraciones en el medio en comparación con los medidos en la entrada de las plantas depuradoras. A pesar de esta eficiencia en cuanto a su eliminación, es común encontrar PB en el medio natural, aunque en bajas concentraciones (Haman *et al.*, 2015). MeP es fácilmente biodegradable en condiciones aeróbicas (Hernández *et al.*, 2010), estimándose un tiempo de 10 horas hasta que su concentración comienza a descender en ríos. La persistencia en medios acuáticos aumenta conforme aumenta la longitud de la cadena del compuesto (González-Mariño *et al.*, 2011).

La asimilación de PB en los tejidos y la permeabilidad a través de la piel de los organismos disminuyen al aumentar la longitud de la cadena del éster, dependiendo también de la fórmula del producto (Ramaswamy *et al.*, 2011a), siendo así el MeP el que se encuentra mayoritariamente en organismos acuáticos. Estudios sobre peces salvajes de todo el mundo muestran que todos ellos contienen altas concentraciones de PB, especialmente de MeP (hasta un 80%) en sus tejidos (Ramaswamy *et al.*, 2011a), lo que muestra una presencia a nivel global de PB en el medio acuático.

Los patrones de distribución de PB en los diferentes compartimentos acuáticos varían según la composición de los productos comerciales destinados al uso diario, con una marcada predominancia de MeP sobre propilparabeno (PrP) y el resto de PB (Haman *et al.*, 2015). La mayor concentración registrada de PB en el medio fue de $459 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MeP) en una fosa séptica (Teerlink *et al.*, 2012). Su continuo encuentro e introducción en el medio ambiente puede ser explicado por el alto consumo y cada vez mayor, de productos comerciales con estos compuestos como conservante antimicrobiano (Haman *et al.*, 2015).

El uso común y predominante de MeP y PrP, con frecuencia en combinación, en los productos cosméticos para incrementar los efectos preservativos (Brausch y Rand, 2011; Guo y Kannan, 2013) explica la frecuencia de detección más alta para estos dos compuestos (Haman *et al.*, 2015) sobre el resto de PB, además de ser los más solubles y menos tóxicos.

Numerosos estudios han demostrado que los PB provocan toxicidad aguda (Nunes *et al.*, 2005; Terasaki *et al.*, 2009; Gambardella *et al.*, 2014; y crónica (Dobbins *et al.*, 2009; Sukumaran y Grant, 2013; Terasaki *et al.*, 2015) en organismos acuáticos. Estos resultados indican que hay efectos negativos potenciales en este tipo de organismos continuamente expuestos a los PB.

En ecosistemas acuáticos encontramos concentraciones de MeP que van desde unas pocas decenas (Benijts *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Canosa *et al.*, 2006; Jonkers *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2011b) hasta varias centenas de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Peng *et al.*, 2008) e incluso se han llegado a encontrar concentraciones de $1062 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en el delta del río Perla, en Guangzhou, al Sur de China (Peng *et al.*, 2008).

Por todo lo expuesto anteriormente, se hace necesario el estudio intensivo de estos compuestos para entender mejor sus riesgos y efectos en los diferentes niveles de población. Se decidió trabajar con MeP en el presente estudio por ser el más abundante en aguas naturales y poseer la menor toxicidad, ya que de esta manera, si a una concentración dada el MeP causa efecto, necesariamente otro PB de cadena más larga también lo causará.

2.2. *Artemia* como modelo en estudios de Ecotoxicología

Taxonomía del género *Artemia*:

Phylum: *Arthropoda* (Siebold y Stannius, 1848)

Subphylum: *Crustacea* (Pennant, 1777)

Clase: *Branchiopoda* (Latreille, 1806)

Orden: *Anostraca* (Sars, 1867)

Familia: *Artemiidae* (Grochowski, 1896)

Género: *Artemia* (Leach, 1819)

En la actualidad existen 6 especies hermanas pertenecientes a las cepas bisexuales o zigogenéticas de *Artemia*, es decir, poblaciones compuestas por individuos machos y hembras: *A. franciscana* (Kellogg, 1906), *A. permisilis* (Piccinelli y Prosdocimi, 1968), *A. salina* (Leach, 1819), *A. urmiana* (Gunther, 1890), *A. sinica* (Cai, 1989), *A. tibetiana* (Abatzopoulos *et al.*, 1998), y poblaciones partenogénicas

(Artom, 1931), compuestas exclusivamente por hembras, no siendo necesaria la fertilización de los huevos para la reproducción (Medina, 2012).

Como branquiópodos, los individuos pertenecientes al género *Artemia* muestran un cuerpo formado por segmentos bien aparentes, con pereiópodos birrameos y filopodiales en el tórax, que ejercen funciones locomotoras, respiratorias y excretoras. Como anostráceos destaca la ausencia de caparazón rígido (Medina, 2012). El aspecto general de su cuerpo es delgado y alargado (figura 1), de un tamaño medio de 8 – 10 mm para los machos y de 10 – 12 mm para las hembras. El cuerpo se divide en cabeza, tórax y abdomen, claramente diferenciados.

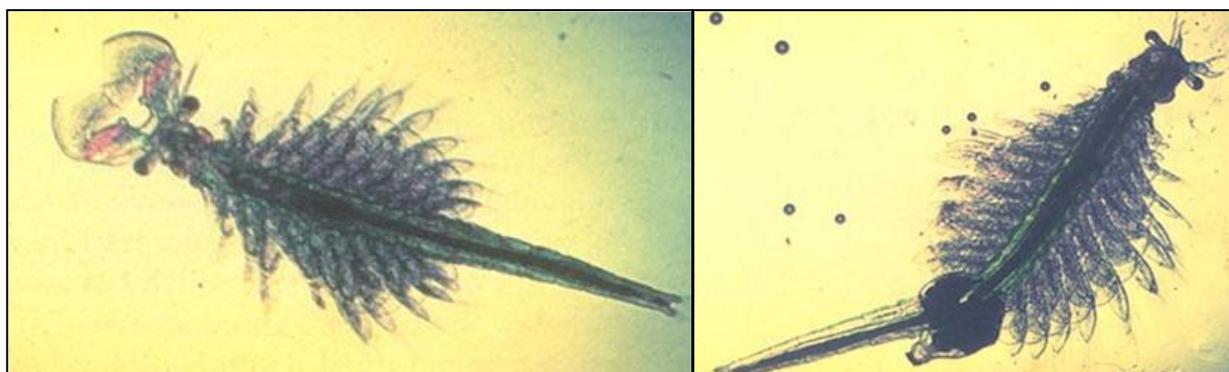


Figura 1. Ejemplares de *Artemia*. A la izquierda, ejemplar macho; a la derecha, ejemplar hembra. Fuente: fao.org.

Artemia es un crustáceo filtrador obligado y no selectivo, que ingiere partículas en un rango de tamaño de 1 a 50 μm (Hund-Rinke y Simon, 2006; Medina, 2012). Su alimentación se basa en la captura de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos, materia orgánica microparticulada y detritos del medio en el que vive. Los nauplios se nutren de las reservas vitelinas acumuladas en el llamado órgano nupal, hasta el estado larvario II. A partir de este momento, el alimento es capturado por filtración mediante las segundas antenas.

Las especies del género *Artemia* están distribuidas por todo el planeta con excepción del continente antártico. Éstas se caracterizan por habitar biotopos hipersalinos, con escasa diversidad animal y vegetal, y con una limitada presencia de predadores. La salinidad es el factor externo más importante que condiciona tanto su desarrollo y reproducción como la dinámica de sus poblaciones. Aunque *Artemia* ha sido encontrada en ambientes con salinidades comprendidas entre 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 370 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, los límites inferiores parecen estar condicionados por la presencia de sus predadores y

competidores. *Artemia* es pues, uno de los mejores osmorreguladores del reino animal. Para ello necesita mecanismos especializados en la excreción activa de sales, además de la ingesta de agua para reemplazar la que pierde por ósmosis. En general, los umbrales térmicos máximo y mínimo de supervivencia para este género se sitúan entre 5 y 35 °C, aunque estos límites no son fijos y varían según cada especie y población (Medina, 2012). Además, *Artemia* debe hacer frente de forma habitual a un medio con una escasa cantidad de oxígeno disponible, con constantes situaciones de hipoxia (concentraciones menores de 2 ml O₂·L⁻¹) y anoxia, teniendo que recurrir, en ocasiones, al metabolismo anaeróbico para poder sobrevivir.

Artemia puede presentar dos modalidades de reproducción excluyentes, una anfígónica o bisexual, con presencia de machos y hembras, y otra partenogenética telítoca, con presencia exclusiva de hembras. No se ha encontrado ninguna especie o cepa que pueda alternar cíclicamente ambas formas. En ambos casos, *Artemia* puede presentar dos tipos de estrategias reproductivas: la ovovivípara, con un desarrollo total de la primera forma larvaria o nauplio en el interior del ovisaco de la hembra, y ovípara, con la interrupción del proceso de desarrollo embrionario, en estado de blástula avanzada, y la formación de una envoltura externa o corion, resistente a las agresiones ambientales, dando lugar a un huevo cístico o quiste de resistencia. Estos quistes son liberados por la hembra al medio y encierran embriones en estado de criptobiosis (metabolismo detenido) controlado por factores endógenos (diapausa), permaneciendo en este estado hasta que una determinada señal ambiental produce ciertas condiciones endógenas con el resultado de la desactivación de la diapausa. En este instante los embriones aún prosiguen con el metabolismo detenido (criptobiosis), pero ahora el control de dicha detención pasa a ser ambiental (quiescencia). Cuando los factores ambientales que mantienen al quiste en estado de quiescencia desaparecen, el embrión reemprende su desarrollo hasta eclosionar en forma de nauplio. Así, dichos quistes pueden permanecer en estado de latencia por períodos prolongados tras una deshidratación efectiva, y eclosionar posteriormente dando origen a nauplios de forma inmediata, cuando se den las condiciones adecuadas para su rehidratación y eclosión. Estas posibilidades permiten la obtención masiva de nauplios de *Artemia* a partir de quistes en el laboratorio. En general, el desarrollo ovovivíparo se produce cuando las condiciones ambientales permiten la viabilidad de los nauplios y el desarrollo de la población sin limitaciones, mientras que el proceso ovíparo asegura una protección frente a condiciones desfavorables, una reserva de propágulos viables y la aparición de una nueva población cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas. A partir de la eclosión, el desarrollo metamórfico es

común para todos los individuos, procedentes de ambos tipos de reproducción. Del nauplio libre o estado larvario I, tras una primera muda, aparecerá el estado larvario II o metanauplio, que tras sucesivos procesos de muda irá evolucionando hasta alcanzar los estados juvenil y adulto.

La expansión de la acuicultura a escala mundial, ha provocado la aparición de problemas relacionados con la biodiversidad en algunas de las regiones en las que se está desarrollando esta actividad. La consecuencia inmediata de este incremento es el aumento del tráfico comercial de *Artemia* con destino a la acuicultura, ya que se ha intentado reproducir la red trófica marina en cautividad, siendo el tercer eslabón de esta red, casi exclusivo para larvas o nauplios de *Artemia*. Éstos presentan tamaños óptimos (400 – 600 μm) para su uso como alimento vivo. La especie *Artemia franciscana* procedente del Great Salt Lake (Utah, EEUU) y de las salinas de la bahía de San Francisco (California, EEUU), se está utilizando de forma generalizada como alimento vivo para larvicultura en todo el mundo. Estas zonas siempre han sido y continúan siendo en la actualidad, la principal fuente de quistes de origen natural, con una excelente calidad del producto final, siendo capaces de abastecer y exportar quistes de *A. franciscana* a todo el mundo. Como consecuencia, dicha especie se ha introducido, intencionadamente o no, en ecosistemas hipersalinos distribuidos por todo el planeta, considerándose pues, especie invasora y poniendo en peligro el estatus de distribución biogeográfica y de biodiversidad existente entre las especies autóctonas. Otro factor de introducción de esta especie es la actividad de explotación salinera, donde permite la eliminación de microalgas, bacterias y materia orgánica particulada existente en las salmueras gracias a su actividad como organismo filtrador no selectivo, garantizando así la obtención de sal de mayor calidad (Amat *et al.*, 2005). En Europa se han detectado poblaciones de esta especie en España, Portugal, Francia e Italia (Amat *et al.*, 2005).

Hoy en día, a pesar de haber introducido alternativas al uso de *Artemia* como alimento en larvicultura, como partículas inertes, combinadas con el uso de biomasa congelada o liofilizada de *Artemia* adulta, los nauplios de *Artemia* para dicho fin son insustituibles, por lo que hay que velar por su conservación a través de una explotación sostenible y la no contaminación de su ecosistema. Ya que la disponibilidad de *Artemia* condiciona la actividad y el desarrollo de la acuicultura de especies marinas carnívoras.

En los últimos años se está utilizando el género *Artemia* como organismo modelo en estudios de ecotoxicología en medios marinos e hipersalinos de contaminantes

emergentes como nanopartículas y parabenos (Nunes *et al.*, 2006b; Libralato, 2014). Se definen como especies modelo aquellas que permiten realizar estudios sobre determinados caracteres y cuyos resultados pueden ser extrapolados a otras especies congénicas (Medina, 2012).

Las distintas poblaciones de *Artemia* pueden fijar contaminantes ambientales por filtración y pueden ser consideradas como un vector de dichos contaminantes (Varó *et al.*, 2002, Nunes *et al.*, 2006a) por su posición en la cadena trófica y debido a que contaminantes como MeP se adhieren al cuerpo de estos organismos, ya que gracias a su cierta hidrofobicidad, muestra tendencia a unirse a los compartimentos orgánicos (Haman *et al.*, 2015). Además, la contaminación de ecosistemas acuáticos favorece la pérdida de biodiversidad, por lo que es necesario estudiar los efectos que tienen estos contaminantes sobre los organismos y los riesgos derivados de su presencia en el medio.

Por todos los motivos descritos, se considera a la especie *A. franciscana* ideal para estudios de ecotoxicología acuática. Además, es conveniente tener conocimiento sobre cómo afectan contaminantes emergentes como los parabenos en poblaciones de organismos como *Artemia* por constituir un factor imprescindible y limitante para el desarrollo de la acuicultura a nivel mundial.

2.3. Biomarcadores

Por definición, un biomarcador es un cambio bioquímico, celular, fisiológico o del comportamiento que puede ser medido en un tejido, fluido biológico, organismo o población y que proporciona evidencia de exposición a, y efectos de uno o más contaminantes.

El uso de biomarcadores en ecotoxicología se está convirtiendo en una herramienta útil, y diversos puntos finales se han propuesto como herramientas valiosas para evaluar los efectos de la contaminación química del medio ambiente. Entre los marcadores bioquímicos más utilizados se encuentran las alteraciones enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo y la inhibición de las colinesterasas (ChEs), por ser los más sensibles a la presencia de xenobióticos en el medio (Nunes *et al.*, 2006b).

El análisis de ChE se usa como indicador de neurotoxicidad (Nunes *et al.*, 2006b). La ChE es una enzima asociada con el sistema nervioso colinérgico, cuya función consiste en finalizar la transmisión sináptica hidrolizando la acetilcolina (ACh), que es el neurotransmisor en muchas sinapsis, especialmente en las neuronas motoras. Así, durante la neurotransmisión, la ACh se libera desde el nervio de la hendidura sináptica y se une a los receptores ACh en la membrana post-sináptica retransmitiendo la señal del nervio. ChE también está situada en la membrana post-sináptica, lugar donde termina la transmisión de la señal por la hidrólisis de ACh, formando tiocolina.

La enzima glutatión-S-transferasa (GST) está involucrada en la fase II de los procesos de biotransformación, combinando las moléculas resultantes de la fase I, incrementando su solubilidad y facilitando la excreción de la molécula del organismo. Es una enzima de gran importancia en mecanismos de detoxificación celular, eliminando y biotransformando xenobióticos o sustancias nocivas para las células catalizando el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico o glutatión reducido (GSH) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. Esta conjugación xenobiótico-GSH permite la protección de los grupos nucleófilos vitales en macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Los ácidos mercaptúricos formados pueden ser excretados más fácilmente (Nunes *et al.*, 2006b).

La *ratio* RNA/DNA se define como un índice del estado nutricional y la tasa de crecimiento en larvas y en las primeras fases de desarrollo (Buckley, 1984; Melzner *et al.*, 2005; Tillner *et al.*, 2015). Postulando que la cantidad de ADN por célula es constante y que la cantidad de RNA por célula varía con la actividad anabólica debido a un aumento de la transcripción, la *ratio* ARN/ADN se utiliza ampliamente como un parámetro de crecimiento en diferentes organismos acuáticos (Melzner *et al.*, 2005; Buckley *et al.*, 2008; Tillner *et al.*, 2015).

Dichas enzimas, ChE y GST, son muy sensibles a la presencia de ciertas sustancias contaminantes en el medio acuático, especialmente la ChE, a compuestos organofosforados y carbamatos. En organismos filtradores como *Artemia*, la inhibición de la actividad ChE, por ejemplo, se traduce en una disminución de la actividad motora del individuo, lo que implica que no puedan realizar sus funciones fisiológicas de respiración, natación y alimentación, entre otras, causando la muerte en último término.

Por todo lo descrito, y ante la ausencia de información bibliográfica sobre el efecto de MeP en dichas enzimas, fue necesario llevar a cabo su análisis para obtener información útil y novedosa. Lo mismo ocurre con RNA y DNA.

2.4. Objetivos

El objetivo del presente estudio es analizar la toxicidad de un contaminante emergente, metilparabeno en *Artemia franciscana*, para evaluar el posible nivel de riesgo existente para invertebrados en medios acuáticos marinos e hipersalinos.

Para ello, se ha realizado un diseño experimental para determinar la toxicidad aguda (LC_{50}), así como el efecto sobre diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos, tales como la supervivencia, crecimiento, actividad de las enzimas colinesterasa y glutatión-S-transferasa y *ratio* de RNA/DNA, tras la exposición a concentraciones subletales durante 9 días.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Organismos

Para este estudio se utilizaron individuos de la especie bisexual americana *A. franciscana*. Esta especie es cosmopolita y ha sido introducida a nivel mundial debido a su gran uso en acuicultura como alimento larvario. Además, su fácil manejo en el laboratorio y el gran conocimiento que se tiene de su biología, fisiología y reproducción hace que esta especie se utilice como modelo en estudios de ecotoxicología acuática en medios marinos e hipersalinos (Nunes *et al.*, 2006a). Se emplearon quistes deshidratados comerciales de la casa INVE (Bélgica), que se eclosionaron siguiendo el procedimiento descrito en Amat (1985) y Medina (2012).

Los quistes una vez pesados (0.150 - 0.202 g), se hidrataron en agua de mar ($37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en tubos cilindrocónicos de 1L de capacidad, dotados de un sistema de aireación individual por burbujeo de aire desde el fondo, mantenidos en baño termostatzado a 28 °C y expuestos a una iluminación constante de 1000 lux. Una vez transcurridas 24 horas se procedió a la recogida de los nauplios. Para ello se retiró la aireación, de tal manera que los individuos recién eclosionados se acumularon en el fondo cónico junto con los quistes no eclosionados y a lo largo del tubo en la columna de agua, mientras que los restos de cáscaras quedaron en la superficie. Los nauplios fueron retirados mediante sifonado y filtrados con una red de 100 μm de luz de malla, depositándose a continuación en una placa de Petri con agua de mar filtrada. Se recolectaron con ayuda de una pipeta Pasteur gracias a su fototropismo positivo. A continuación se traspasaron a otra placa con agua de mar filtrada, repitiéndose este proceso hasta tres veces para asegurar la completa limpieza de la muestra (ausencia de individuos muertos, cáscaras de quistes y/o quistes sin eclosionar).

3.2. Compuesto químico

En el presente estudio se utilizó el metilparabeno (MeP; $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$; número CAS: 99-76-3) de la casa SUPELCO, que fue suministrado por SIGMA. La elección del compuesto se basó en su uso habitual como conservante en cosmética y productos de consumo entre la población, así como por haberse detectado en ocasiones en zonas costeras españolas y/o salinas debido a la llegada de las aguas residuales procedente de plantas depuradoras (Serrano *et al.*, 2012).

3.3. Test de toxicidad aguda: determinación de LC₅₀

Las pruebas de toxicidad aguda son experiencias que se realizan para estimar los efectos nocivos de xenobióticos a través del análisis de la respuesta de los organismos cuando son expuestos a un rango de concentraciones creciente de la misma durante cortos periodos de tiempo (24 – 96 h), en relación con el ciclo vital del organismo expuesto. El parámetro más utilizado en los test de toxicidad es la mortalidad. Para determinar la toxicidad del MeP se calculó la concentración letal 50 (LC₅₀), definida como la concentración a la cual muere el 50% de los individuos expuestos a un compuesto tóxico en un tiempo de exposición determinado.

El ensayo se llevó a cabo según Sarabia (2012), con algunas modificaciones, evaluando la mortalidad de los nauplios de *Artemia* de 24 horas de vida (instar II-III).

El ensayo de toxicidad consistió en la exposición a 6 concentraciones crecientes de MeP, además de un grupo control (C, expuesto a agua de mar esterilizada) y un grupo control acetona (CA), consistente en agua de mar esterilizada y con una concentración de acetona igual a la presente en la concentración más alta de MeP ensayada (1.69%) (Varó *et al.*, 2015). Éstas se prepararon a partir de un stock de 1000 ppm (mg·L⁻¹) que se consiguió disolviendo 100 mg de MeP en 100 ml de agua de mar esterilizada. Para facilitar la disolución del MeP en agua de mar se utilizó acetona pura (3 ml/100 ml). A continuación se realizaron diluciones seriadas para obtener el rango de concentraciones deseado. Tras varios ensayos de tanteo, se acotó el intervalo de exposición entre 100 – 562.34 ppm, decidiendo exponer a los individuos a las siguientes concentraciones nominales de tóxico, basadas en una escala Log₁₀: 10, 100, 141.25, 199.52, 316.2, 562.34 ppm.

Para realizar los ensayos de toxicidad se utilizaron placas multipocillo (Multiwell®) de 12 pocillos con 5 ml de capacidad máxima. Cada pocillo contenía 2 ml de cada una de las concentraciones de MeP a estudiar. Se expusieron 10 ± 2 nauplios instar II-III por pocillo. La exposición a las distintas concentraciones y controles (C y CA) se realizó por triplicado. A su vez, todo el procedimiento se llevó a cabo por duplicado, obteniéndose así 6 réplicas por tratamiento con un total de aproximadamente 60 individuos expuestos (figura 2). Previa a la exposición de los nauplios fue necesario un lavado de los mismos en la concentración correspondiente, para lo cual fueron manipulados con ayuda de una pequeña jeringuilla de vidrio, con objeto de evitar diluir las soluciones finales. Los nauplios se mantuvieron durante 24 horas en una cámara de incubación termostatazada a una temperatura constante de 25 ± 1 °C y en total oscuridad. Durante el tiempo de exposición no se suministró alimento a los nauplios.

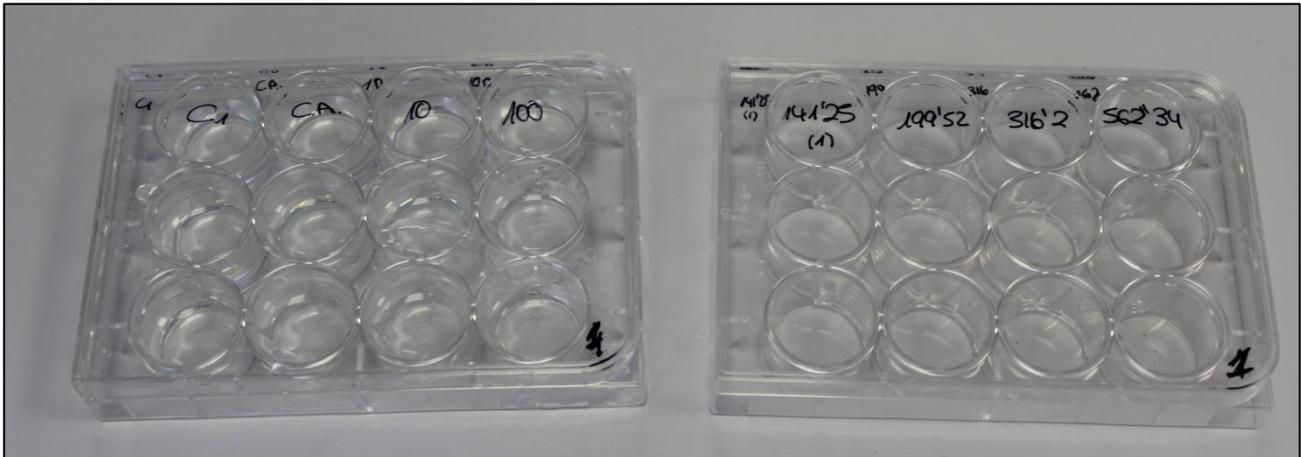


Figura 2. Placas multiwell de 12 pocillos utilizadas para la exposición a MeP durante el ensayo de determinación de la LC₅₀. Estas dos placas corresponden a una de las dos réplicas realizadas. Los números escritos son cada una de las concentraciones, expresadas en ppm, a las que se someten los individuos de esa columna (triplicado); C y CA se refieren a los tratamientos control y control acetona, respectivamente.

Transcurridas 24 horas, se contaron los individuos muertos con ayuda de una lupa binocular. Los individuos que mostraban movimiento nulo se consideraron como muertos, entendiendo como movimiento nulo, el hecho de que un organismo no varíe su posición durante 5 segundos (Garaventa *et al.*, 2010).

Es importante destacar que para que el resultado del ensayo de toxicidad sea válido, la mortalidad del grupo control debe ser menor al 10%. En caso contrario, es necesario repetir la experiencia.

3.4. Ensayo de toxicidad crónica

A partir del valor de la LC₅₀, se eligieron dos concentraciones subletales (0.05 y 0.1 ppm) para realizar el estudio de toxicidad crónica. Se hicieron dos réplicas de cada tratamiento (C, CA, 0.05 y 0.1 ppm) en recipientes de vidrio de 800 ml de capacidad total. El volumen del medio de exposición fue de 250 ml, que se preparó en matraces aforados con agua de mar estéril y la concentración de MeP y de alimento correspondiente. El mismo procedimiento se siguió para el C y CA. Como alimento se usó la microalga *Tetraselmis suecica*, a una densidad de $1 \pm 0.5 \cdot 10^6$ cel·ml⁻¹. Dicha microalga se cultiva de manera permanente en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC) y está considerada como alimento adecuado para los cultivos de *Artemia*

(Varó *et al.*, 2015). La densidad de nauplios en cada tratamiento fue de 3 – 5 nauplios·ml⁻¹ (aproximadamente 1000 individuos totales). El ensayo duró 15 días, con renovación completa de medio cada día de toma de muestras (2, 5, 7 y 9 días). La experiencia se llevó a cabo en una cámara termostatzada a una temperatura constante de 25 ± 1 °C, con fotoperiodo 12 horas luz – 12 horas oscuridad.

Desde el comienzo del ensayo se tomaron muestras por triplicado a diferentes edades para su posterior análisis: 200 individuos de 24 horas de vida, 150 a los 2 días de exposición, 75 a los 5 días, 50 a los 7 días y 10 a los 9 días (tabla 2). Dichas muestras se recogieron con ayuda de una jeringuilla de vidrio en tubos Eppendorf en su tampón correspondiente (tampón fosfato (TF) o tampón Tris-EDTA (TE) y almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

Las concentraciones de 0.05 y 0.1 ppm, se prepararon a partir de una solución intermedia de 10 ppm, preparada con agua de mar estéril, mediante diluciones seriadas de la solución stock de 1000 ppm de MeP (figura 3). Así, los porcentajes de acetona para 0.1 y 0.05 ppm fueron de 0.0003 y 0.00015%, respectivamente. Para preparar el CA, que debe tener un porcentaje de acetona igual la mayor de las concentraciones ensayadas (0.0003%), se siguió el mismo procedimiento.



Figura 3. Preparación de las diferentes concentraciones de exposición mediante diluciones seriadas.

El control de la densidad del cultivo microalgal (*T. suecica*) para ajustar el alimento en los ensayos de toxicidad crónica se realizó mediante el conteo del número de células en una cámara de Neubauer (hematocitómetro). Al tratarse de células móviles se fijaron las muestras con una solución de yodo (lugol), para facilitar su conteo (Medina, 2012).

Tabla 2. Número de organismos recogidos (n) para su posterior análisis en función del tiempo de exposición, para cada uno de los tratamientos estudiados.

GRUPOS EXPERIMENTALES					
	0 horas	48 horas	5 días	7 días	9 días
Control					
Control Acetona					
0.05 ppm	n ≈ 200	n ≈ 150	n ≈ 75	n ≈ 50	n ≈ 10
0.1 ppm					

3.4.1. Preparación de las muestras

Una vez recogidas todas las muestras y congeladas a -80 °C, se descongelaron y homogenizaron manualmente en un volumen de tampón mínimo (50 – 100 µl) con ayuda de una varilla de plástico para Eppendorf. A continuación se sonicaron las muestras durante 2 minutos, enrasaron hasta 500 µl con el tampón correspondiente y centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se descartó el pellet o precipitado recogiendo el sobrenadante y repartiéndose en alícuotas para la determinación de los diferentes biomarcadores. Todas las alícuotas se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

3.4.2. Supervivencia y crecimiento

Para el seguimiento del crecimiento y la supervivencia se separaron 20 ± 1 nauplios instar II-III para cada uno de los tratamientos a estudiar en tubos tipo *coming* de 50 ml, y enrasados hasta 30 ml con la correspondiente solución (figura 4). Este proceso se realizó por triplicado.

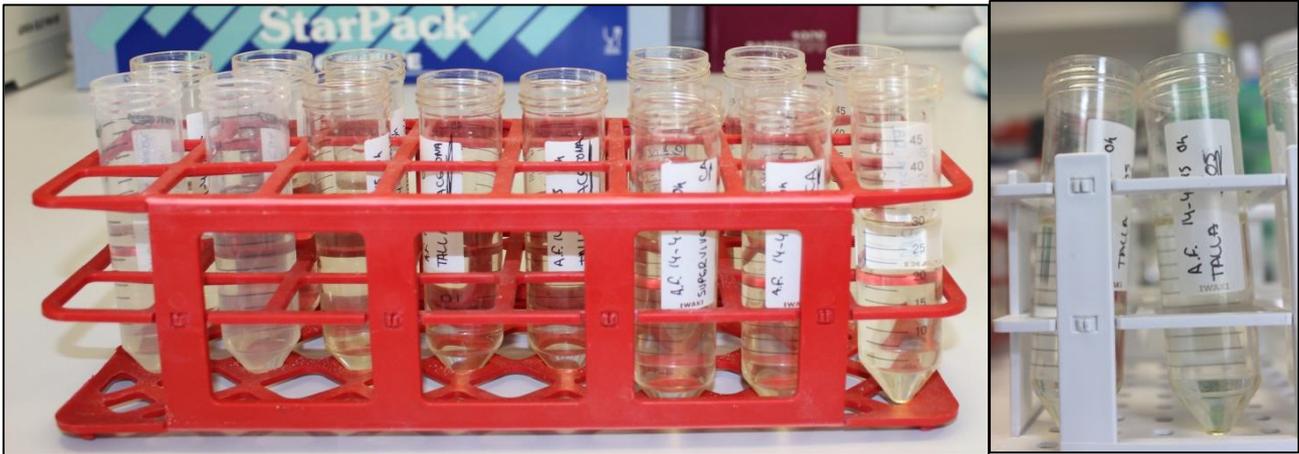


Figura 4. Sistema para el seguimiento de supervivencia y crecimiento de *A. franciscana* en diferentes tratamientos mediante tubos de plástico tipo Corning.

El control del crecimiento y supervivencia se llevó a cabo a diferentes tiempos de exposición, expresados en días: 0, 2, 5, 7 y 9 (figura 5). Los individuos utilizados para determinar la talla (mm) no fueron devueltos ni repuestos. Cada día de control se renovó completamente el medio. Para estimar la talla se separaron 10 individuos por cada tratamiento en una placa de Petri pequeña, los cuales fueron dormidos con agua saturada de cloroformo y medidos con ayuda de la lupa binocular.



Figura 5. Revisión de la supervivencia de los diferentes grupos tratados.

Para determinar la supervivencia se contaron los individuos muertos, respecto al total de organismos expuestos en cada tratamiento. Los individuos que mostraban movimiento nulo se les consideraron como muertos. El porcentaje de mortalidad se calculó como el nº de individuos muertos/total expuestos por tratamiento · 100.

3.4.3. Determinación de Biomarcadores

3.4.3.1. Colinesterasa

Para determinar la actividad de la enzima colinesterasa, se realizó un ensayo basado en el método Ellman *et al.* (1961), adaptado a microplaca siguiendo el procedimiento descrito en Varó *et al.* (2015), y usando ATC (acetiltiocolina) como sustrato.

El ensayo se realizó en microplaca de 96 pocillos (figura 6). La actividad ChE se determinó en 100 µl de cada muestra, por triplicado, que se mezcló con 200 µl de la “solución de reacción (SR)” preparada en fresco con: 100 mM TF, (pH 7.4, con 150mM KCL), 0.75 mM ATC y 10 mM DTNB (5,5´-ditio-bis (2-dinitrobenzoico). Para el blanco se utilizaron 100 µl de TF que se dispusieron la primera columna de la placa. La reacción fue medida cinéticamente a una longitud de onda de 415 nm en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution), a 25 °C durante 15 minutos (1 ciclo por minuto), tras un periodo de incubación previo de 15 minutos en oscuridad. La actividad ChE fue expresada como nanomoles del sustrato hidrolizado por minuto por microgramo de proteína (nmol/min · µg proteína).

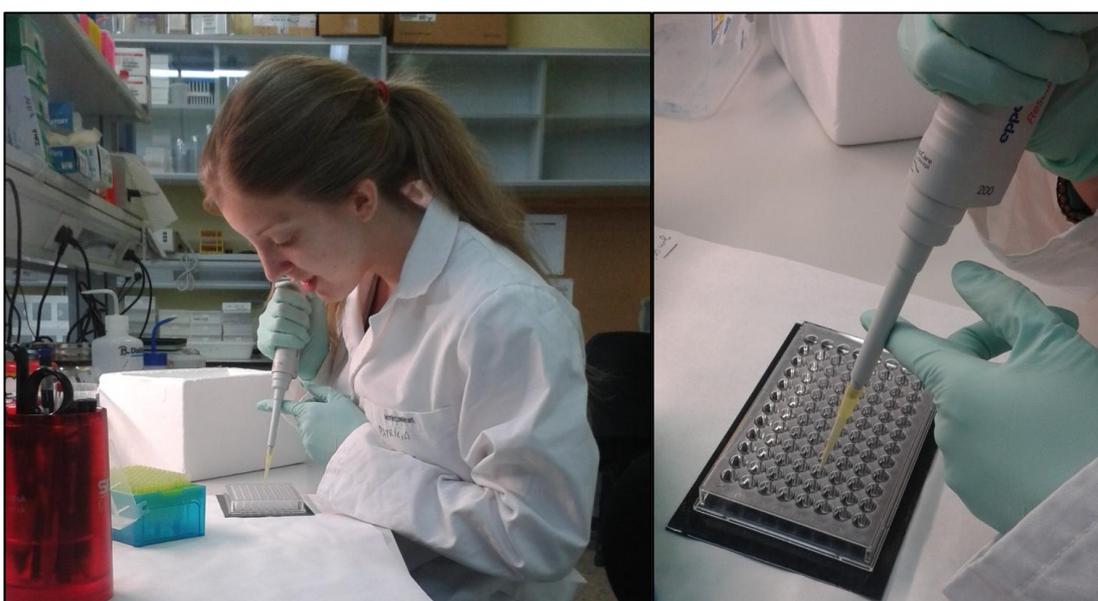


Figura 6. Preparación de microplaca para el análisis de la actividad ChE en muestras de *A. franciscana*.

La actividad de ChE se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Pendiente (Abs/min)} \cdot \text{volumen total } (\mu\text{l}) \cdot 1000 \cdot \text{factor de dilucion}}{\varepsilon (\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot \text{volumen muestra} \cdot \text{proteina } (\mu\text{g/ml}) \cdot \text{correccion de trayectoria de la luz}} =$$
$$= \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g proteina}^{-1}$$

Los cálculos se basan en la ley de Lambert-Berr, donde: *Pendiente* = incremento de absorbancia por minuto; ε es el coeficiente de extinción molar del ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico a 405 – 415 nm y tiene un valor de $13.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($13.6 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); *prot* ($\mu\text{g/ml}$) = cantidad de proteína total de la muestra y la corrección de trayectoria de la luz = 0.9 cm.

La reacción se basa en la velocidad a la que reacciona el DTNB y la tiocolina, que en las condiciones utilizadas, tiene lugar rápidamente. Por tanto, la velocidad es equivalente a la reacción catalizada por la enzima, pudiéndose así calcular su actividad (Ellman *et al.*, 1961).

3.4.3.2. Glutatión-S-Transferasa

El ensayo de GST, basado en Habig, (1974) se realizó en microplaca siguiendo el procedimiento descrito en Solé *et al.* (2015). Para medir la actividad GST se pipetearon 50 μl de muestras por triplicado, que se mezclaron rápidamente con 175 μl de “solución de reacción” preparada en fresco con TF (100 mM pH 7.4, con 150mM KCL) que contenía 1mM de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno) y 1mM GSH (glutatión reducido). Para el blanco se utilizaron 50 μl de TF, por triplicado, situados en la primera columna (figura 7). A continuación, la reacción fue medida cinéticamente a una longitud de onda de 340 nm en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution) a 25 °C, durante 15 minutos (1 ciclo por minuto). La actividad GST fue expresada como nanomoles del sustrato hidrolizado por minuto por microgramo de proteína.

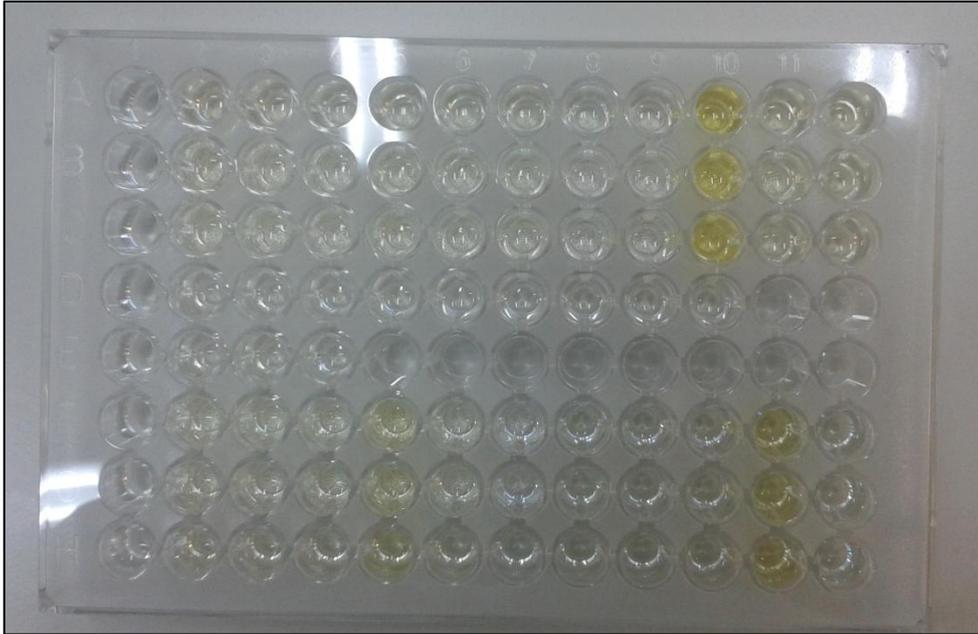


Figura 7. Microplaca tras haber analizado la actividad GST. En la primera columna se puede apreciar el blanco. La mayor actividad de la enzima se observa en los pocillos que presentan mayor coloración.

La actividad de la GST por microgramo de proteína se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Pendiente (Abs/min)} \cdot \text{volumen total } (\mu\text{l}) \cdot 1000 \cdot \text{factor de dilucion}}{\varepsilon \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot \text{volumen muestra} \cdot \text{proteina } (\mu\text{g/ml}) \cdot \text{correccion de trayectoria de la luz}} =$$

$$= \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g proteina}^{-1}$$

Donde: *Pendiente* = incremento de absorbancia por minuto; *prot* ($\mu\text{g/ml}$) = cantidad de proteína total de la muestra y en este caso, $\varepsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y la corrección de trayectoria de la luz = 0.8 cm.

3.4.3.3. Ratio RNA/DNA

El tampón de homogenización utilizado en este caso fue tampón TE (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA; pH 7.5). El contenido de RNA y DNA en cada muestra se determinó según el método descrito por Varó *et al.* (2007) usando el kit de “RiboGreen™ RNA Quantitation Kit” y el “PicoGreen™ DNA Quantitation Kit” respectivamente (Molecular Probes). Para cuantificar el RNA de las muestras se utilizó una curva patrón con concentraciones crecientes de RNA entre 0 y 2000 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, preparada a partir del stock de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ en TE del estándar RNA ribosomal (16S y 23S de *E. coli*) del kit.

En el ensayo de RNA, se pipeteó 1 μl de DNasa I (1x) a cada pocillo y se añadieron 50 μl de muestra diluida (1/40) o patrón (por triplicado). Tras un periodo de incubación de 1 hora a 37 °C, se añaden a todos los pocillos 50 μl de tampón TE y 100 μl de *Ribogreen* diluido 200x. La cantidad de RNA se obtuvo midiendo la fluorescencia a unas longitudes de onda de 485 nm de excitación y 535 nm de emisión en un lector de microplaca Tecan (Ultra Evolution), tras un periodo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La cantidad de RNA de las muestras fue expresada en $\mu\text{g RNA}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de la curva patrón.

Por otro lado, el contenido de DNA de cada muestra se determinó a partir de una curva patrón con concentraciones crecientes de DNA entre 0 y 2000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, preparada a partir del stock 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en TE del estándar Lambda DNA del kit. En el ensayo de DNA, se pipetearon 10 μl de RNasa I (1/400) a cada pocillo y se añadieron 50 μl de muestra diluida (1/4) o patrón (por triplicado). Tras un periodo de incubación de 1 hora a 37 °C, se añaden a todos los pocillos 50 μl de tampón TE y 100 μl de *Picogreen* diluido 200x. La cantidad de DNA se obtuvo midiendo la fluorescencia a unas longitudes de onda de 485 nm de excitación y 535 nm de emisión en un lector de microplaca Tecan (Ultra Evolution) tras un periodo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La cantidad de DNA de las muestras fue expresada en $\mu\text{g DNA}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de la curva patrón.

3.4.3.4. Proteína total

El contenido de proteína total en cada muestra se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976) adaptado a microplaca, utilizando el kit comercial de Bio-Rad y albúmina bovina pura (BSA) como estándar. Para la curva patrón se utilizaron concentraciones crecientes de BSA entre 0 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de alícuotas de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de BSA.

En el ensayo se pipetearon 10 μl de cada concentración de patrón de BSA y 10 μl de muestra sin diluir (todo por triplicado). A continuación se añadieron 200 μl de solución Bio-Rad diluida (relación 1:5) a todos los pocillos. La absorbancia fue medida en un lector de microplaca Tecan (Ultra Evolution) a 595 nm de longitud de onda, tras un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. El valor de absorbancia obtenido se interpoló en la curva patrón para determinar la concentración de proteína en cada muestra, expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

El contenido de proteína total se determinó previamente por el método de Lowry adaptado a microplaca, utilizando el kit de determinación de Bio-Rad que emplea el reactivo de fenol-Folin-Ciocalteu. Como patrón se usó BSA. Para la curva patrón se utilizaron concentraciones crecientes de BSA entre 0 y 1.4 mg·ml⁻¹. En el ensayo se pipetearon en cada pocillo 20 µl de patrón o de muestra diluida (1/2), a los que se añadió 10 µl de la solución A (solución alcalina de cobre) y 80 µl de la solución B (reactivo de Folin), dejando un periodo de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se midió la absorbancia en un lector de microplaca Tecan (Ultra Evolution) a 750 nm de longitud de onda. El valor de absorbancia obtenido se interpoló en la curva patrón para determinar la concentración de proteína (mg·ml⁻¹) en cada muestra. Sin embargo, se decidió calcular dicha concentración por el método de Bradford por ser más sensible que Lowry y debido a que este último creaba gran turbidez en los pocillos que contenían muestra (figura 8), hecho que dificultaba el paso de haz de luz, obteniéndose así resultados incorrectos.

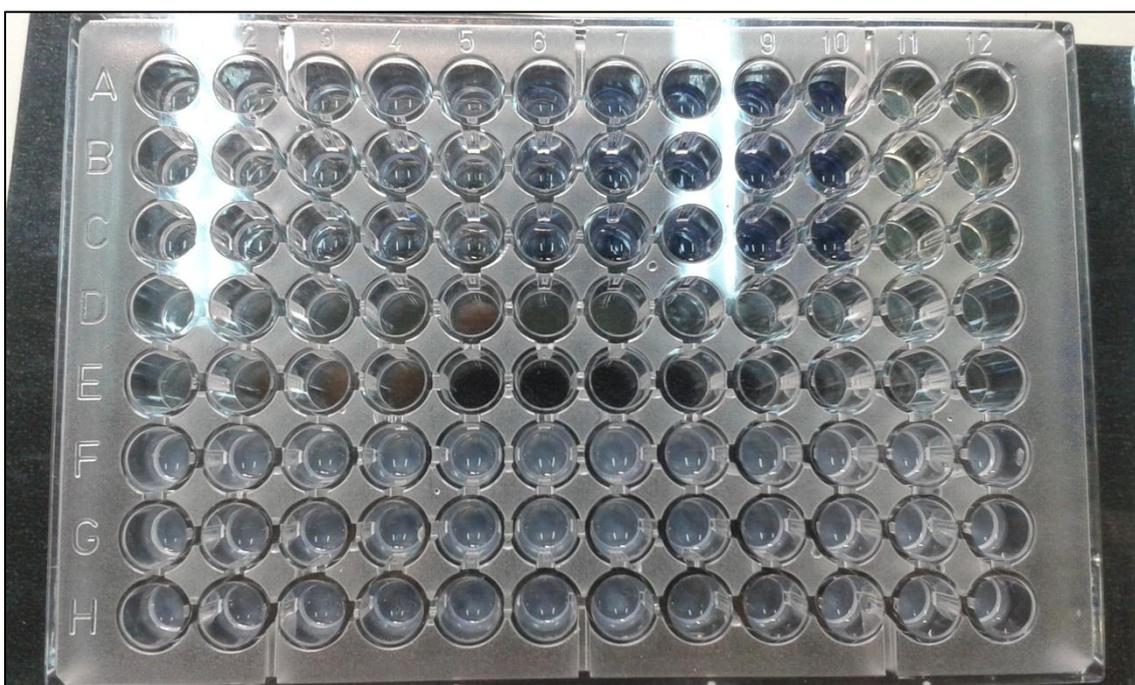


Figura 8. Microplaca tras el análisis del contenido de proteína total de muestras de *A. franciscana* mediante el método de Lowry. La parte superior corresponde a la curva patrón (con agua bidestilada, ddH₂O), mientras que la parte inferior pertenece a las muestras diluidas (1/2) con TF, donde se puede observar cierta turbidez.

3.5. Análisis estadístico

El efecto del MeP sobre la supervivencia se analizó mediante el test de Logrank (Mantel-Cox) para múltiples comparaciones de curvas de supervivencia. La LC_{50} y sus intervalos de confianza se obtuvieron mediante el ajuste de regresión Probit, que se utiliza para analizar experimentos de dosis-respuesta, la cual debe ser siempre binomial (por ejemplo, muerte/no muerte).

La normalidad y homogeneidad de las varianzas de las variables estudiadas (talla y biomarcadores) se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente.

El efecto del tratamiento en cada una de las edades se analizó mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA de 1 vía), seguido de una prueba t de Dunnett *post hoc* para comparar diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto al control. Además, se evaluó mediante un análisis factorial univariado de varianza de dos factores (ANOVA de 2 vías) el efecto debido a los factores tratamiento y tiempo de exposición. Este análisis permite estudiar el efecto que tiene cada factor fijo sobre la variable dependiente observada, así como la interacción de ambos factores sobre la misma. Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba de Bonferroni *post hoc*, por tener un número reducido de comparaciones por grupos (n pequeña), para las variables con varianzas homogéneas, mientras que para varianzas heterogéneas se utilizó la prueba T3 de Dunnett para la comparación múltiple de medias. El nivel de significación se estableció a $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$ para las pruebas *post hoc* y la normalidad y homogeneidad, respectivamente. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar (std). El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software *IBM SPSS Statistics* para el análisis de la talla, LC_{50} y de biomarcadores, y con el programa *PRISM* para el de supervivencia.

4. RESULTADOS

El grupo experimental expuesto a 0.1 ppm de MeP tras 9 días sufrió una mortalidad del 100%, por tanto no se ha podido llevar a cabo la determinación de los biomarcadores estudiados.

Es importante destacar que aunque en las figuras 10, 11, 14, 15 y 16 aparezca un grupo llamado “0 días de exposición”, no fue incluido en el análisis estadístico. Este grupo está formado por un conjunto de 10 individuos, medidos y/o analizados con 24 horas de vida y únicamente tratados con agua de mar estéril, por lo que es únicamente un grupo de referencia de partida para la talla y los diferentes biomarcadores (excepto ChE) a tiempo 0h de exposición (24 horas de vida).

4.1. Test de toxicidad aguda. LC₅₀

El valor de LC₅₀ y sus intervalos de confianza obtenidos mediante el ajuste de regresión Probit para nauplios de *A. franciscana* expuestos durante 24 horas a MeP fue de 131.4 (87.4 - 169.15) ppm.

4.2. Supervivencia y crecimiento

4.2.1. Supervivencia

El efecto del MeP sobre la de supervivencia de *A. franciscana* tras 9 días de exposición a concentraciones subletales se presentan en la figura 9. Los resultados del test de Logrank para múltiples comparaciones de curvas de supervivencia evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo control y el resto de tratamientos, los cuales no presentaron diferencias entre sí.

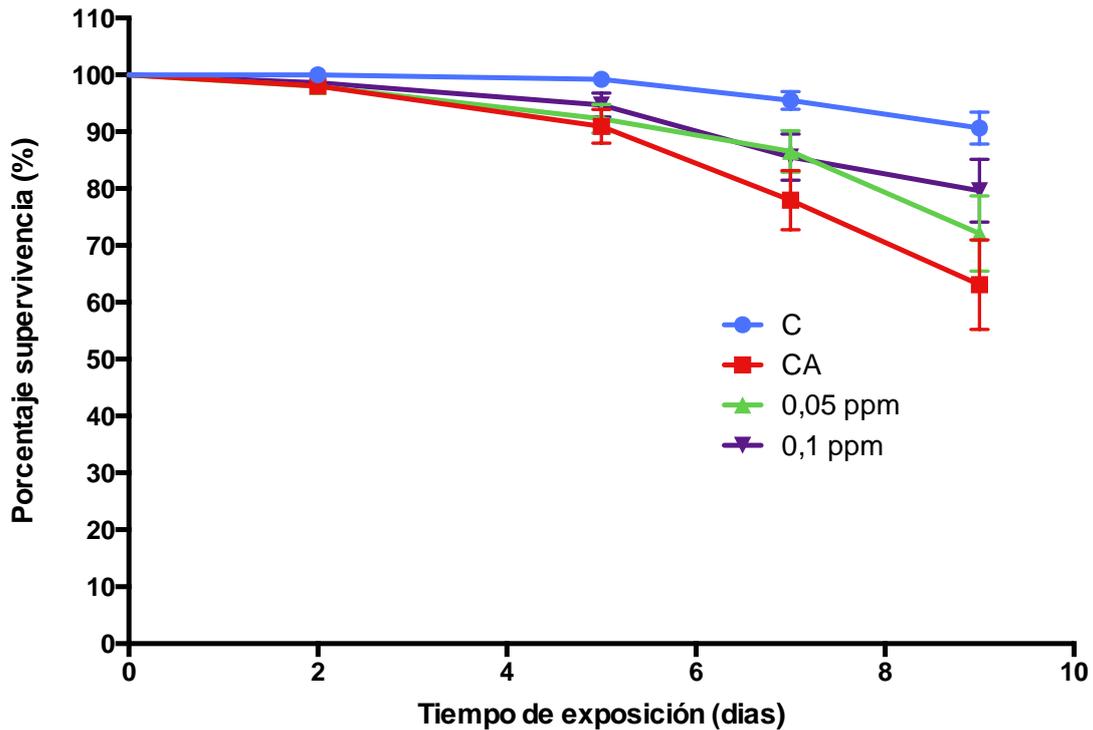


Figura 9. Curvas de supervivencia de *A. franciscana* a lo largo de 9 días de exposición a los diferentes tratamientos: C (control), CA (Control acetona), 0,05 y 0,1 ppm de MeP.

4.2.2. Crecimiento

Los resultados (figura 10) demostraron que no hay diferencias significativas en la actividad de ChE en metanauplios tras dos días de exposición a MeP (ANOVA, $p \geq 0.05$). Sin embargo, se evidenciaron diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$) en el resto de grupos de tiempo. A los 5 días, las diferencias se encontraron en el grupo CA y 0.05 ppm respecto al control (t de Dunnett); a los 7 días, las diferencias se manifestaron sólo en el grupo CA, mientras que a los 9 días, el grupo de 0.05 ppm fue el único diferente al control.

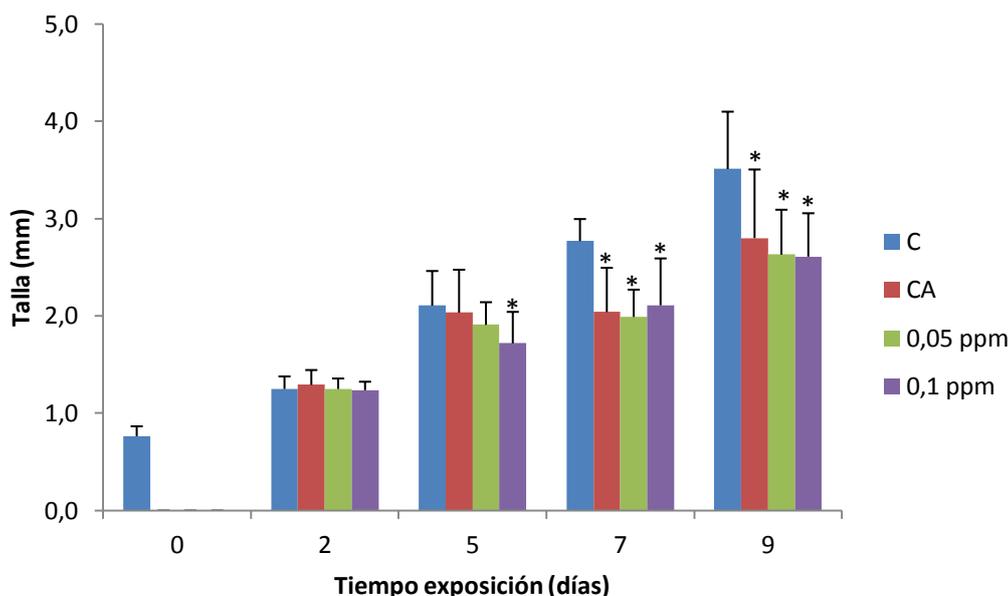


Figura 10. Variación de talla de *A. franciscana* en diferentes tratamientos: C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 ppm de MeP. Los datos que se muestran son las medias \pm std (desviación estándar). (*) señalan diferencias significativas respecto al grupo control para cada tiempo de exposición, de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de 1 vía, y el test *post hoc* t de Dunnett ($p \leq 0.05$).

La talla de los cuatro grupos analizados a lo largo del tiempo se presenta en la figura 11. Se encontraron diferencias siendo significativo tanto el efecto tiempo de exposición como el tratamiento y su interacción (ANOVA 2 vías, $p \leq 0.05$, ver tabla 3). El modelo explica un 71,6% de la varianza (R^2 corregida = 0.716).

Tabla 3. Resultado del análisis ANOVA de dos vías aplicado a la variable crecimiento y a los factores tiempo de exposición y tratamiento. gl son grados de libertad. a. Calculado con alfa = ,05; b. R cuadrado = ,743 (R cuadrado corregida = ,716).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada(a)
Modelo corregido	62,626(b)	15	4,175	27,715	,000	415,725	1,000
Intersección	685,977	1	685,977	4553,657	,000	4553,657	1,000
Tiempo exposición	51,955	3	17,318	114,963	,000	344,889	1,000
Tratamiento	5,935	3	1,978	13,132	,000	39,396	1,000
Interacción	3,873	9	,430	2,856	,004	25,707	,956
Error	21,693	144	,151				
Total	785,359	160					
Total corregida	84,319	159					

La prueba *post hoc* T3 de Dunnett, para varianzas heterogéneas, mostró como grupo homogéneo el compuesto por CA, 0.05 y 0.1 ppm de MeP y significativamente diferente ($p \leq 0.05$) con respecto al control (C) en cuanto a tratamiento; y diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en función del tiempo de exposición (figura 13).

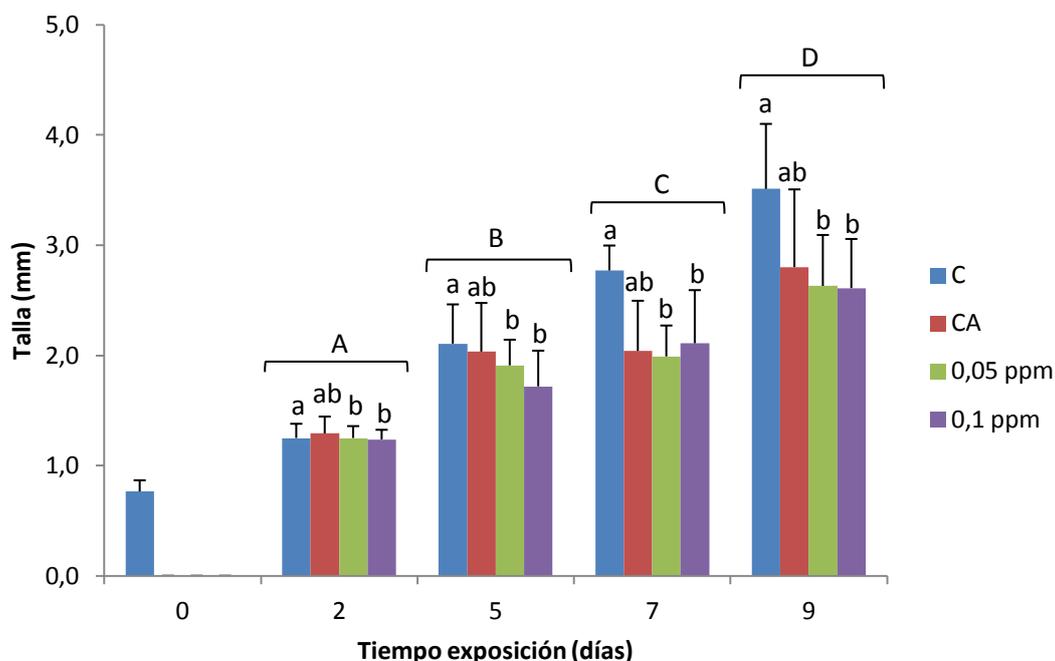


Figura 11. Variación de talla a lo largo del tiempo en los diferentes grupos experimentales: C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 ppm de MeP. Los datos que se muestran son las medias \pm std (desviación estándar). Las letras mayúsculas (A, B, C, D) señalan diferencias significativas entre grupos en función del tiempo de exposición, y las letras minúsculas (a, b) muestran diferencias significativas según el tratamiento, de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de 2 vías y el test *post hoc* T3 de Dunnett ($p \leq 0.05$).

4.3. Biomarcadores

4.3.1. Colinesterasa

Los resultados (figura 12) demostraron que no hay diferencias significativas en la actividad de ChE en metanauplios tras dos días de exposición a MeP (ANOVA, $p \geq 0.05$). Sin embargo, se evidenciaron diferencias significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$) en el resto de grupos de tiempo. A los 5 días, las diferencias se encontraron en el grupo CA y 0.05 ppm respecto al control (t de Dunnett); a los 7 días, las diferencias se manifestaron sólo en el grupo CA, mientras que a los 9 días, el grupo de 0.05 ppm fue el único diferente al control.

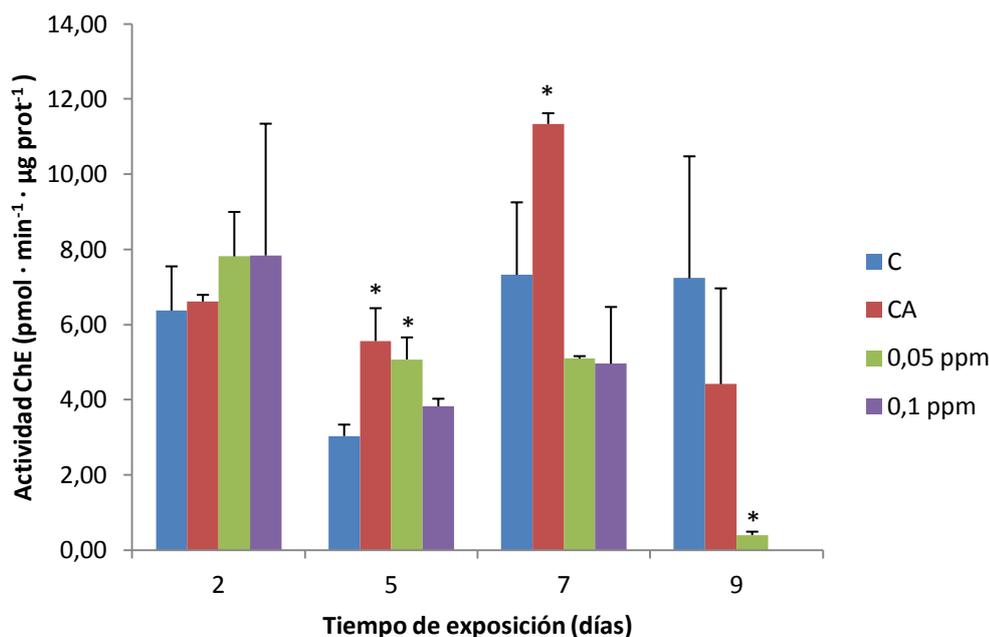


Figura 12. Actividad ChE en *A. franciscana* en diferentes tratamientos: C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 ppm de MeP. Los datos que se muestran son las medias \pm std (desviación estándar). (*) señalan diferencias significativas respecto al grupo control para cada tiempo de exposición, de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de 1 vía, y el test *post hoc* t de Dunnett ($p \leq 0.05$).

En la figura 13 se observa la actividad de la enzima colinesterasa (ChE), expresada en $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ de los diferentes grupos de estudio. La variable cumpli\u00f3 las premisas de normalidad (Shapiro-Wilk $p \geq 0.01$) y homogeneidad de varianzas (test de Levene, $p \geq 0.01$). Se encontraron diferencias significativas en todos los factores (ANOVA 2 v\u00edas, $p \leq 0.05$, ver tabla 4,). La comparaci\u00f3n m\u00faltiple de Bonferroni permiti\u00f3 agrupar las respuestas en dos subconjuntos homog\u00e9neos en ambos factores. Por un lado, el grupo CA fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) al grupo expuesto a 0.05 ppm de MeP, siendo este \u00faltimo el que present\u00f3 el valor m\u00e1s bajo de actividad ChE. Por otro lado, en funci\u00f3n del tiempo de exposici\u00f3n, a los 2 y 7 d\u00edas de exposici\u00f3n la actividad ChE fue significativamente diferente de la que presentaron el grupo de 5 y 9 d\u00edas ($p \leq 0.05$).

Tabla 4. Resultado del análisis ANOVA de dos vías aplicado a la variable actividad de ChE y a los factores tiempo de exposición y tratamiento. gl son grados de libertad. a. Calculado con alfa = ,05; b. R cuadrado = ,735 (R cuadrado corregida = ,597)

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad	Potencia observada(a)
Modelo corregido	254,833(b)	14	18,202	5,337	,000	,735	74,711	1,000
Intersección	1289,478	1	1289,478	378,044	,000	,933	378,044	1,000
Tratamiento	36,311	3	12,104	3,548	,028	,283	10,645	,722
Tiempo exposición	93,173	3	31,058	9,105	,000	,503	27,316	,990
Interacción	127,485	8	15,936	4,672	,001	,581	37,376	,984
Error	92,095	27	3,411					
Total	1794,470	42						
Total corregida	346,928	41						

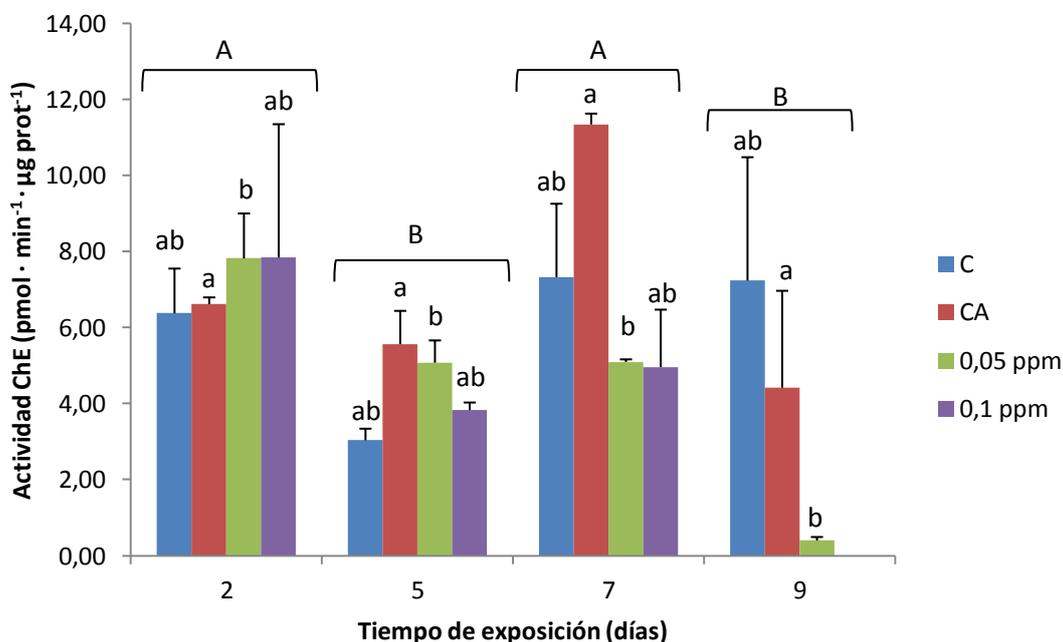


Figura 13. Efecto de los tratamientos sobre la actividad ChE a lo largo del tiempo de exposición. C (control), CA (Control acetona), 0,05 y 0,1 ppm de MeP. Los datos que se muestran son las medias \pm std (desviación estándar). Las letras mayúsculas (A, y B) señalan diferencias significativas entre grupos en función del tiempo de exposición, y las letras minúsculas (a, b) muestran diferencias significativas según el tratamiento, de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de 2 vías, y el test *post hoc* de Bonferroni ($p \leq 0.05$).

4.3.2. Glutación-S-transferasa

Los resultados (figura 14) evidenciaron que la actividad GST no se ve afectada por MeP a lo largo del tiempo (ANOVA, $p \geq 0.05$). Sin embargo, a los 9 días de exposición, se observaron diferencias significativas entre CA y C (ANOVA, $p \leq 0.05$).

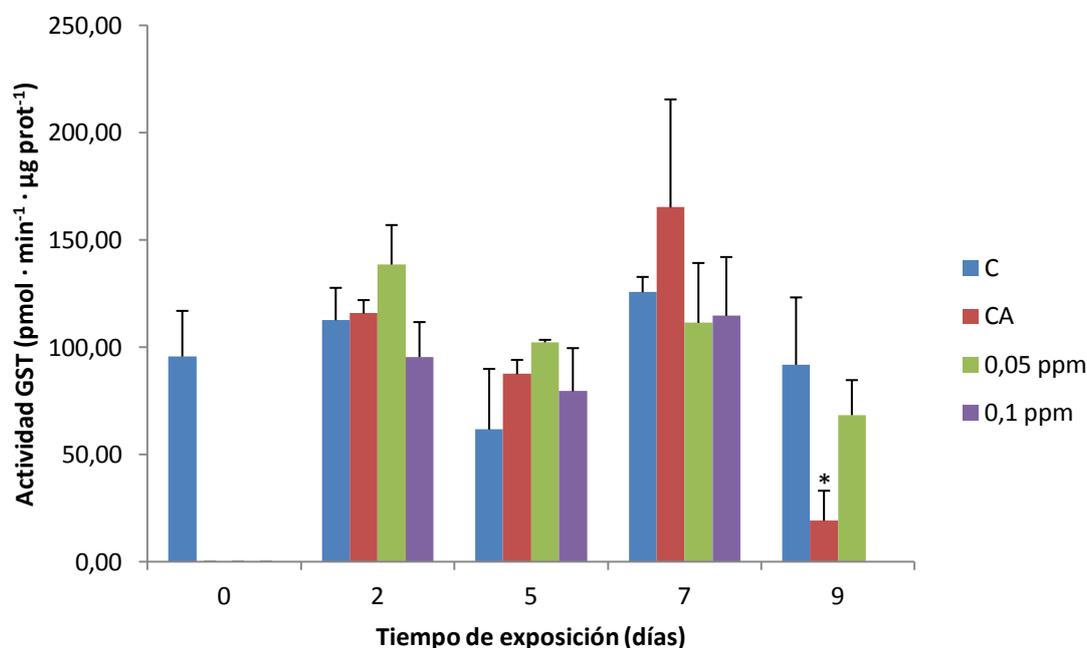


Figura 14. Actividad GST en *A. franciscana* en diferentes tratamientos: C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 ppm de MeP. Los datos que se muestran son las medias \pm std (desviación estándar). (*) señala diferencias significativas respecto al grupo control para cada tiempo de exposición, de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de 1 vía, y el test *post hoc* t de Dunnett ($p \leq 0.05$).

En la figura 15 se observa la actividad de la enzima GST, expresada en $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1}$ de los diferentes grupos de estudio. La variable GST cumplió las premisas de normalidad (Shapiro-Wilk $p \geq 0.01$) rechazando la hipótesis de homogeneidad de varianzas (test de Levene, $p \leq 0.01$). La actividad de GST mostró diferencias significativas en función del tiempo de exposición y en la interacción de los dos factores analizados (tiempo de exposición y tratamiento) (ANOVA 2 vías, $p \leq 0.05$, ver tabla 5). La prueba de comparación múltiple T3 de Dunnett permitió agrupar como subconjuntos homogéneos por un lado, los grupos de 2 y 7 días de exposición, y por otro, los grupos de 5 y 9 días, que fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) entre sí. El grupo de 7 días presentó la actividad más alta de GST, mientras que el valor más bajo le corresponde al grupo de 9 días. El factor tratamiento no mostró diferencias significativas entre pares de grupos experimentales analizados ($p \geq 0.05$).

Tabla 5. Resultado del análisis ANOVA de dos vías aplicado a la variable actividad de GST y a los factores tiempo de exposición y tratamiento. gl son grados de libertad. a. Calculado con alfa = ,05; b. R cuadrado = ,794 (R cuadrado corregida = ,679)

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad	Potencia observada(a)
Modelo corregido	48300,162(b)	14	3450,012	6,882	,000	,794	96,352	1,000
Intersección	348474,203	1	348474,203	695,159	,000	,965	695,159	1,000
Tratamiento	2038,510	3	679,503	1,356	,279	,140	4,067	,316
Tiempo exposición	26460,914	3	8820,305	17,595	,000	,679	52,786	1,000
Interacción	14326,576	8	1790,822	3,572	,007	,533	28,580	,934
Error	12532,170	25	501,287					
Total	452421,021	40						
Total corregida	60832,331	39						

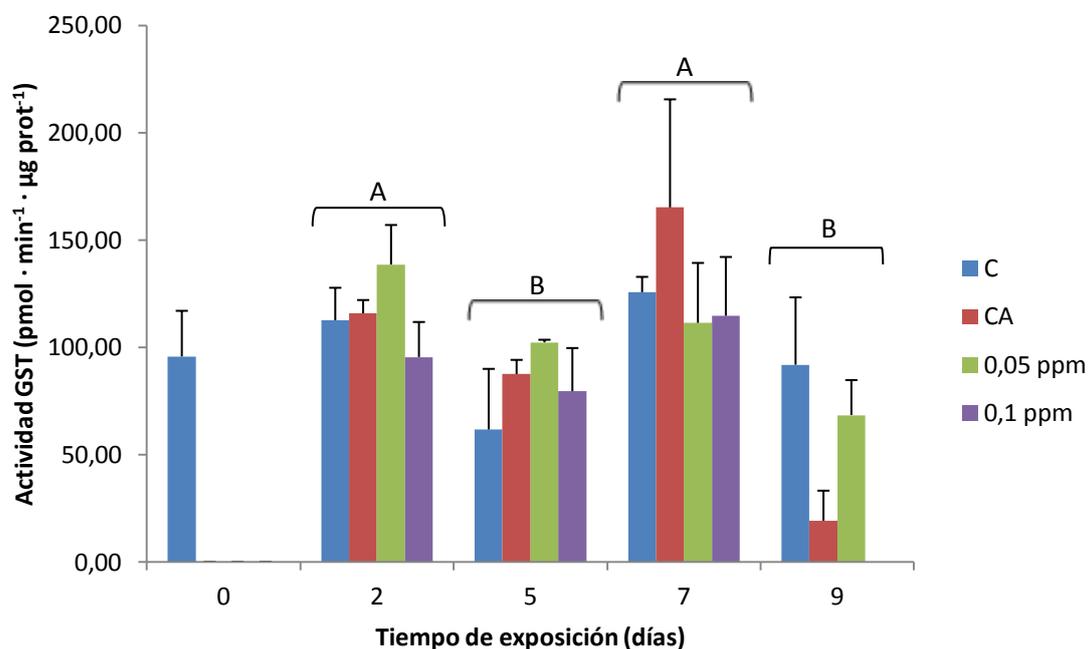


Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre la actividad GST a lo largo del tiempo de exposición. C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 ppm de MeP. Los datos que se muestran son las medias \pm std (desviación estándar). Las letras mayúsculas (A, y B) señalan diferencias significativas entre grupos en función del tiempo de exposición, y las letras minúsculas (a, b) muestran diferencias significativas según el tratamiento, de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de 2 vías, y el test *post hoc* de Bonferroni ($p \leq 0.05$).

4.3.3. Ratio RNA/DNA

En la figura 16 se observa la relación RNA/DNA de los diferentes grupos de estudio. Las varianzas resultaron homogéneas (test de Levene, $p \geq 0.01$), y sin diferencias significativas en ninguno de los factores estudiados (ANOVA 2 vías, $p \geq 0.05$, ver tabla 6). Al no encontrar diferencias significativas por grupos, no fue necesario realizar análisis *post hoc*.

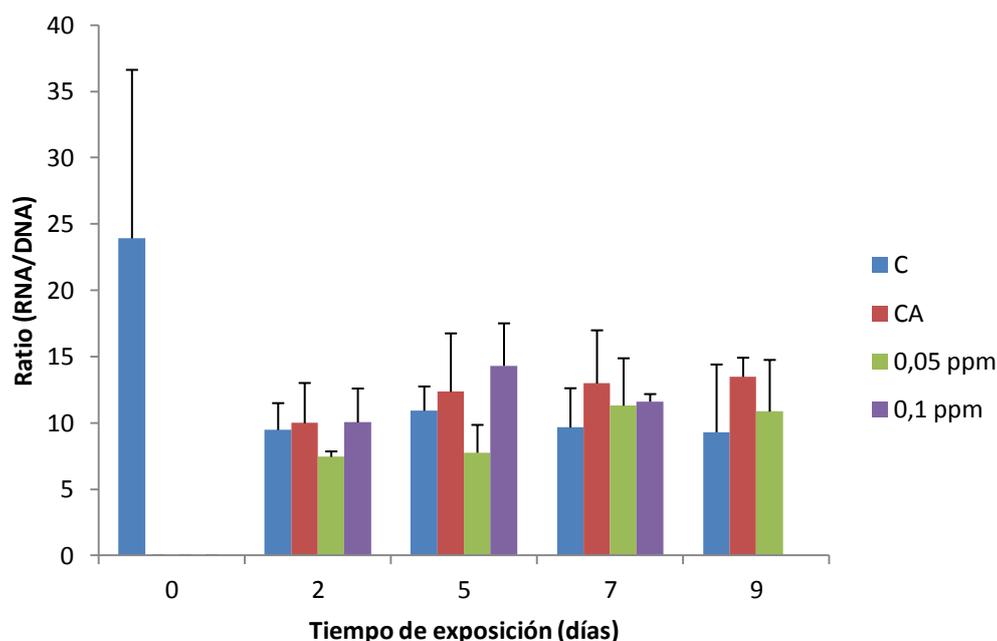


Figura 16. Representación de la variación de la relación RNA/DNA en los diferentes grupos experimentales: C (control), CA (control acetona), 0.05 y 0.1 ppm de MeP. Los datos que se muestran son las medias \pm std (desviación estándar).

Tabla 6. Resultado del análisis ANOVA de dos vías aplicado a la variable *Ratio* RNA/DNA y a los factores tiempo de exposición y tratamiento. gl son grados de libertad. a. Calculado con alfa = ,05; b. R cuadrado = ,403 (R cuadrado corregida = ,093)

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad	Potencia observada(a)
Modelo corregido	160,998(b)	14	11,500	1,300	,270	,403	18,202	,590
Intersección	4667,318	1	4667,318	527,668	,000	,951	527,668	1,000
Tratamiento	71,284	3	23,761	2,686	,066	,230	8,059	,588
Tiempo exposición	41,339	3	13,780	1,558	,222	,148	4,674	,363
Interacción	42,179	8	5,272	,596	,773	,150	4,769	,219
Error	238,820	27	8,845					
Total	5273,710	42						
Total corregida	399,818	41						

5. DISCUSIÓN

Los resultados de la exposición aguda indican que los nauplios de *A. franciscana* son poco sensibles al MeP, ya que el valor de LC_{50} a las 24 horas (131.4 ppm) está por encima de 100 ppm, rango que se considera como no tóxico para organismos acuáticos. Los niveles de toxicidad de los químicos para los organismos acuáticos se clasifican en: muy tóxico, $LC_{50} < 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; tóxico, $LC_{50} 1 - 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; perjudicial, $LC_{50} 10 - 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; y no tóxico, $LC_{50} > 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Commission of the European Communities, 1996). La relación entre la longitud de la cadena de los parabenos y su toxicidad ha quedado demostrada en numerosas ocasiones (Terasaki *et al.*, 2009, 2015; Yamamoto *et al.*, 2011), siendo los menos tóxicos los de cadena corta, como es el caso de MeP. Ensayos con *Daphnia magna* expuesta a MeP (Terasaki *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2011) indican que es perjudicial para dicho crustáceo ($EC_{50} 41 - 62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), hecho que contrasta con la menor sensibilidad de *A. franciscana* al MeP en relación con *Daphnia*. Estudios previos de toxicidad aguda en diferentes especies de *Artemia* con pesticidas organofosforados (Varó *et al.*, 2002, 2015), o con compuestos emergentes como nanopartículas metálicas (Gambardella *et al.*, 2014) o medicamentos (Nunes *et al.*, 2005), demuestran la gran resistencia del género *Artemia*, aunque la sensibilidad varíe entre las diferentes especies y poblaciones (Varó *et al.*, 1998, Sarabia *et al.*, 2002). De hecho, el MeP si lo comparamos con otros compuestos es mucho menos tóxico que clorpirifos para *A. franciscana* (LC_{50} 24 horas = $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Varó *et al.*, 2002), al igual que ocurre con medicamentos como diazepam ($LC_{50} = 12.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido clofibrico ($LC_{50} = 87.22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) o clofibrato ($LC_{50} = 36.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y detergentes como dodecilsulfato sódico ($LC_{50} = 12.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para *A. parthenogenetica* (Nunes *et al.*, 2005).

La exposición crónica de *A. franciscana* a MeP (0.05 y 0.1 ppm) durante 9 días causa una mortalidad significativamente superior a la del grupo control obteniendo un rango de supervivencia entre el 70 – 80%. El solvente acetona también afecta a la supervivencia, produciendo una mortalidad de aproximadamente un 37%. Terasaki *et al.* (2015) expusieron al crustáceo *Ceriodaphnia dubia* durante 7 días a concentraciones de MeP mayores a las estudiadas en el presente trabajo, obteniendo una supervivencia final muy superior (80 – 100%) a la encontrada aquí, lo que sugiere que *A. franciscana*, durante sus primeras fases de desarrollo, es más sensible a exposiciones crónicas de MeP que *C. dubia*. Esta última a su vez, es más sensible que *D. magna* (Dobbins *et al.*, 2009). La supervivencia observada fue inferior a la registrada por otros autores con la misma especie de *Artemia* expuesta a clorpirifos (Varó *et al.*, 2015). En este trabajo, la supervivencia de *Artemia* a los 10 días de

exposición, a concentraciones entre 10 – 100 veces menores a las ensayadas en el presente estudio fue superior al 80%. Nuestros resultados se asemejan más a los encontrados en dos especies de *Artemia* (*A. franciscana* y *A. parthenogenetica*) por Sukumaran y Grant (2013), quienes utilizaron un compuesto genotóxico, el etil metano sulfonato (EMS). La supervivencia a los 30 días de exposición fue aproximadamente del 60%, excepto a la mayor concentración (160 ppm), que fue del 18% aproximadamente.

El crecimiento se ve afectado por el MeP a partir de los 5 días de exposición, presentando diferencias significativas respecto al grupo control sólo el expuesto a la máxima concentración utilizada (0.1 ppm). Durante los días siguientes, todos los tratamientos, incluido CA, presentaron un crecimiento menor que el control, siendo significativa la interacción de los dos factores analizados, tiempo de exposición y tratamiento. La talla (mm) aumentó con la edad (desarrollo) durante los 9 días de exposición de forma significativa en todos los tratamientos. Los mismos resultados se observaron en individuos de *Artemia*, incluyendo la especie *A. franciscana*, expuestos de forma crónica a otros compuestos, como el EMS (genotóxico) y el clorpirifos (Sukumaran y Grant, 2013; Varó *et al.*, 2015).

La actividad enzimática colinesterasa (ChE) se ve afectada por los diferentes tratamientos estudiados. Así, a partir de los 5 días de exposición, la actividad ChE de los grupos CA y 0.05 ppm presentaron diferencias respecto al control. Cabe destacar que la actividad más baja se ha encontrado en el grupo de 0.05 ppm a los 9 días. La actividad ChE es frecuentemente utilizada como biomarcador clásico de neurotoxicidad en estudios de contaminación acuática (Varó *et al.*, 2002). Los efectos como consecuencia de la exposición a parabenos pueden ser de particular interés ecotoxicológico ya que hasta hace unos años, los compuestos neurotóxicos por excelencia eran los organofosforados y carbamatos.

Nuestros resultados confirman los obtenidos previamente en ensayos con otras especies de *Artemia*, en las cuales la actividad ChE se ve afectada tras la exposición a medicamentos y nanopartículas metálicas (Nunes *et al.*, 2006b, Gambardella *et al.*, 2013, 2014). En el presente estudio, la actividad ChE del grupo control a las 48 horas ($6.37 \pm 1.18 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g prote\i na}^{-1}$) es superior (aproximadamente el doble) que la determinada en otros trabajos realizados por Varó *et al.* (2002) y Nunes *et al.* (2006b) para ese mismo tiempo en *A. parthenogenetica* ($3.69 \pm 0.17 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\i na}^{-1}$ y $3.72 \pm 1.81 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\i na}^{-1}$ respectivamente). Este hecho podría indicar una mayor resistencia de *A. franciscana* frente a la presencia en el medio de compuestos

con potencial efecto neurotóxico como MeP. Sin embargo, se observa que a los 7 días se produce un aumento de la actividad de la ChE en el grupo control, contrariamente a lo descrito para esta misma especie por Varó *et al.* (2015) y para otros crustáceos por Solé *et al.* (2006), que describen una relación inversa con el desarrollo.

La exposición de *Artemia* a las concentraciones estudiadas de MeP no afecta a la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, el solvente (la acetona) causa una disminución significativa de la actividad GST en el grupo CA con respecto al control a los 9 días de exposición. Además, el único aumento de actividad GST (en todos los grupos tratados) se produce a los 7 días de exposición, presentándose el valor más alto en el grupo CA. Dicho aumento puede ser un indicador de estrés oxidativo (Gambardella *et al.*, 2014).

En este estudio la exposición de *A. franciscana* a MeP, al igual que ocurre con otros compuestos como nanopartículas metálicas y medicamentos, no causó un efecto sobre la actividad GST (Nunes *et al.*, 2006b; Gambardella *et al.*, 2014). El hecho de no haber diferencias significativas por la presencia del MeP puede ser debido a que además de los procesos metabólicos de detoxificación y eliminación de xenobióticos en *Artemia*, la excreción del mismo se pueda producir también a través de las branquias al agua circundante, aumentando la eliminación del MeP. La actividad GST determinada en *A. franciscana* a las 48 horas en el grupo control ($112.60 \pm 15.12 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g proteína}^{-1}$) fue aproximadamente el doble de la obtenida por Nunes *et al.* (2006b) para *A. parthenogenetica* ($66.07 \pm 34.22 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$). Esto podría indicar que la especie *A. franciscana* posee mecanismos más eficaces de detoxificación frente a xenobióticos que la especie asexual del género.

La exposición a MeP de *A. franciscana* no parece causar efecto alguno en la *ratio* RNA/DNA. Un estudio realizado con *Cyprinus carpio* (Tillner *et al.*, 2015), encontró diferencias en los valores de la *ratio* según la alimentación. Así, la *ratio* RNA/DNA a los 8 días de vida varió desde 0.65 ± 0.27 hasta 1.10 ± 0.18 en función del alimento basado en dos especies de nematodos, mientras que con el uso de alimento seco y *Artemia*, la *ratio* RNA/DNA fue 1.35 ± 0.26 y 1.54 ± 0.15 respectivamente. Otro estudio realizado durante 10 días en *Sepia officinalis* (Melzner *et al.*, 2005), demostró que mayores raciones de alimento se traducían en mayores proporciones RNA/DNA, y por tanto, mayores tasas de crecimiento, con *ratios* de RNA/DNA desde 0.91 para raciones pequeñas hasta 1.13 para las grandes aproximadamente. Nuestros resultados a la misma edad que los estudios realizados en la carpa y en la sepia, a 7 y 9 días de exposición, fueron de 9.66 ± 2.97 y 9.31 ± 5.11 respectivamente, lo que

demuestra que la tasa de crecimiento en los primeros estadios del desarrollo es mayor en *A. franciscana* (aunque se observan valores muy altos de desviación estándar). Además, debido a las variaciones encontradas en dichos estudios y el hecho de que no se hayan encontrado diferencias entre el grupo control y los tratamientos con MeP en el presente trabajo, se puede suponer que la presencia de un tóxico en el medio como MeP no condiciona la tasa de crecimiento, sino que el factor realmente más limitante sería la calidad nutricional del alimento (Tillner *et al.*, 2015).

La gran mayoría de los estudios de toxicidad realizados con parabenos se refieren a peces y mamíferos, los cuales incorporan los componentes tóxicos vía oral o intraperitoneal (Asnani y Verma, 2009; Vo y Jeung, 2009; Popa *et al.*, 2011; Goswami y Kalita, 2013). Este hecho dificulta en gran medida la extrapolación de los datos obtenidos en nuestro experimento.

La difusión pasiva a través de las branquias es una ruta de entrada predominante de los compuestos presentes en el medio, para crustáceos (Nunes *et al.*, 2006b). Los animales utilizados en este estudio fueron expuestos a concentraciones de MeP mucho más elevadas de las que realmente se encuentran en el medio ambiente. Datos sobre las concentraciones ambientales de parabenos, incluido MeP, sugieren un riesgo muy bajo en la actualidad para organismos acuáticos, ya que las concentraciones estudiadas de estos compuestos que causan efectos nocivos son generalmente hasta 1000 veces superiores a los observados en el medio natural (Brausch y Rand, 2011). En nuestro caso, el rango estudiado es 500 – 1000 veces superior a los valores medios ambientales (Jonkers *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2008 Ramaswamy *et al.*, 2011b).

Cabe destacar que otros contaminantes ambientales, ya sean fármacos u otros compuestos antropogénicos, pueden contribuir de forma sinérgica a los efectos observados de MeP (Nunes *et al.*, 2006b).

En relación con los biomarcadores analizados se ha demostrado que la actividad ChE se ve alterada por la presencia de MeP, indicando ser un biomarcador sensible ante estos compuestos. Mientras que la actividad GST y la *ratio* RNA/DNA no se ven afectadas por MeP.

Para futuras experiencias relacionadas con el estudio presentado, se recomienda disminuir la densidad de cultivo, debido a que se observó disminución de movilidad y crecimiento y retraso en el desarrollo de los individuos, así como un aumento del estrés y la mortalidad en los diferentes stocks expuestos, creemos como consecuencia

de una gran densidad de población. Además, basándonos en el principio de “las 3R” (refinar, reducir y reemplazar), se ha intentado utilizar el mínimo número de individuos para cada uno de los tratamientos, lo que ha limitado el número de biomarcadores determinados en este estudio. Otro problema encontrado ha sido el 100% de mortalidad del grupo expuesto a 0.1 ppm de MeP a los 9 días, no pudiéndose obtener resultados. Este hecho, además de la mortalidad derivada del tratamiento, ha podido deberse a varias razones, como una mala calidad de eclosión o de los quistes utilizados, errores o excesiva manipulación de los nauplios, o incluso como consecuencia de la elevada densidad de individuos, ya comentada.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas del presente estudio son las siguientes:

- a. Tras la evaluación de la toxicidad aguda, se ha establecido que el metilparabeno no es tóxico para *A. franciscana*.
- b. Se demuestra que una exposición crónica de *A. franciscana* a metilparabeno causa efectos nocivos sobre el organismo. Los parámetros supervivencia, crecimiento y actividad de la enzima colinesterasa se ven afectados por metilparabeno, mientras que la actividad de glutación-S-transferasa y la *ratio* RNA/DNA no muestran alteraciones.
- c. Se deben controlar los vertidos de aguas ricas en parabenos al medio natural; un aumento de sus concentraciones en ecosistemas acuáticos hasta alcanzar las aquí estudiadas, supondría un riesgo ambiental real para ciertas poblaciones de invertebrados acuáticos, como *Artemia*, con una disminución de biodiversidad.
- d. En relación con el punto anterior, una disminución de las poblaciones de la especie *A. franciscana* puede traducirse en un riesgo para el desarrollo de la acuicultura y una pérdida de calidad como recurso explotable (quistes de *Artemia*).

7. BIBLIOGRAFÍA

Amat F, Hontoria F, Ruiz O, Green A J, Sánchez M I, Figuerola J *et al.* The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biol Invasions*. 2005; (7):37-47.

Amat F. Utilización de *Artemia* en acuicultura. Informes Técnicos Investigación Pesquera. 1985; (128-129):1-60.

Andersen F A. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol*. 2008; 4 (27):1-82.

Asnani V M y Verma R J. Ameliorative effects of ginger extract on paraben-induced lipid peroxidation in the liver of mice. *Drug Biochem*. 2009; 3 (66):225-228.

Benijts T, Lambert W, De Leenheer A. Analysis of Multiple Endocrine Disruptors in Environmental Waters via Wide-Spectrum Solid-Phase Extraction and Dual-Polarity Ionization LC-Ion Trap- MS/MS. *Anal Chem*. 2004; (76):704-711.

Blanco B, Casais M C, Mejuto M C, Cela R. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column simple stacking for sensitive determination of parabens and *p*-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta* 2009; 1 (647):104-111.

Bledzka D, Gromadzinska J, Wasowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ Int*. 2014; (67):27-42.

Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol*. 2010; (30):301-312.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 1-2 (72):248-254.

Bratkowska D, Marcé R M, Cormack P A G, Borrull F, Fontanals N. Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples. *Anal Chim Acta*. 2011; 1 (706):135-142.

Brausch J M y Rand G M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*. 2011; (82):1518-1532.

Buckley L J, Caldarone E M, Clemmesen C. Multi-species larval fish growth model based on temperature and fluorometrically derived RNA/DNA ratios: results from a meta-analysis. *Mar Ecol Prog Ser.* 2008; (371):221-232.

Buckley L J. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar Biol.* 1984; (80):291-298.

Canosa P, Rodríguez I, Rubí E, Bollaín M H, Cela R. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. *J Chromatogr A.* 2006; (1124):3-10.

Carmona E, Andreu V, Picó Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Sci Total Environ.* 2014; (484):53.63.

Casas A M, Möder M, Fernández M E. GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. *Anal Bioanal Chem.* 2011; (399):945-953.

Commission of the European Communities. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Office for Official Publications of the European Communities: Luxembourg. 1996.

DEPA. Survey of Parabens – Part of the LOUS – review. Danish Environmental Protection Agency. 2013; 56.

Dobbins L L, Usenko S, Brain R A, Brooks B W. Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environ Toxicol Chem.* 2009; (28):2744-2753.

Ellman G L, Courtney K.D, Andres V, Freatherstone Robert M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 2 (7):88-90.

Gambardella C, Aluigi M G, Ferrando S, Gallus L, Ramoino P, Gatti A M *et al.* Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. *Aquat Toxicol.* 2013; (130-131):77-85.

Gambardella C, Mesaric T, Milivojevic T, Sepcic K, Gallus L, Carbone S *et al.* Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. *Environ Monit Assess.* 2014.

Garaventa F, Gambardella C, Di Fino A, Pittore M, Faimali M. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology.* 2010; (19):512-519.

González-Mariño I, Quintana J B, Rodríguez I, Cela R. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Water Res.* 2011; 20 (45):6770-6780.

Goswami P y Kalita J C. Endocrine disrupting effects of butylparaben: a review. *Inter Res J Pharm.* 2014; (4):1.

Guo Y, Kannan K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol.* 2013; 47 (24):14442-14449.

Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 22 (249):7130-7139.

Haman C, Dauchy X, Rosin C, Muñoz J-F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. *Water Res.* 2015; (68):1-11.

Hernández L, Vieno N, Temmink H, Zeeman G, Buisman C J N. Occurrence of Xenobiotics in Gray Water and Removal in Three Biological Treatment Systems. *Environ Sci Technol.* 2010; 44 (17):6835-6842.

Hund-Rinke K and Simon M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environ Sci Pollut R.* 2006; (13):225-232.

Jonkers N, Kohler H-P, Dammshäuser A, Giger W. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. *Environ Pollut.* 2009; 3 (157):714-723.

Jonkers N, Sousa A, Galanta-Oliveira S, Barroso C M, Kohler H-P E, Giger W. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environ Sci Pollut Res.* 2010; (17):834-843.

Kusk K O, Krüger T, Long M, Taxvig C, Lykkesfeldt A E, Frederiksen H *et al.* Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by in vivo and in vitro assays. *Environ Toxicol Chem.* 2011; 2 (30):413-426.

Lee H-B, Peart T E, Svoboda M L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005; (1094):122-129.

Liao .C, Kannan K. Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. *Sci Total Environ.* 2014; (475):8-15.

Liao C, Lee S, Moon H-B, Yamashita N, Kannan K. Parabens in Sediment and Sewage Sludge from the United States, Japan, and Korea: Spatial Distribution and Temporal Trends. *Environ Sci Technol.* 2013; 47 (19):10895-10902.

Libralato G. The case of *Artemia* spp. In nanoecotoxicology. *Mar Environ Res.* 2014; (101):38-43.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193 (1):265-275.

Medina G R. El recurso de *Artemia* de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura. Universitat de València. 2012; 34-36.

Melzner F, Forsythe J W, Lee P G, Wood J B, Piatkowski U, Clemmesen C. Estimating recent growth in the cuttlefish *Sepia officinalis*: are nucleic acid-based indicators for growth and condition the method of choice? *J Exp Mar Biol Ecol.* 2005; (317):37-51.

Moos R K, Angerer J, Wittsiepe J, Wilhelm M, Brüning T, Koch H M. Rapid determination of nine parabens and seven other environmental phenols in urine samples of German children and adults. *Int J Hyg Envir Heal.* 2014; 8 (217):845-853.

Neves E R, Schäfer S, Phillips A, Canejo J, Macedo M F. Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. *Int Biodeter Biodegr.* 2009; (63):267-272.

Nunes B S, Carvalho F D, Guilhermino L M, Van Stappen G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut.* 2006a; (144):453-462.

Nunes B, Carvalho F, Guilhermino L. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotox Environ Safe.* 2005; (61):414-419.

Nunes B, Carvalho F, Guilhermino L. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere.* 2006b; (62):581-594.

Peng X, Yu Y, Tang C, Tan J, Huang Q, Wang Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Sci Total Environ.* 2008; 1-3 (397):158-166.

Popa D-S, Kiss B, Vlase L, Pop A, Iepure R, Paltinean R *et al.* Study of oxidative stress induction after exposure to bisphenol A and methylparaben in rats. 2011; 4 (59):539-549.

Ramaswamy B R, Kim J-W, Isobe T, Chang K-H, Amano A, Miller T W, *et al.* Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure. *J Hazard Mater.* 2011a; 3 (192):1739-1745.

Ramaswamy B R, Shanmugam G, Velu G, Rengarajan B, Larsson D G J. GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. *J Hazard Mater.* 2011b; (186):1586-1593.

Ramírez N, Borrull F, Marcé R M. Simultaneous determination of parabens and synthetic musks in water by stir-bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2012; 4 (35):580-588.

Sarabia R. Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de *Artemia*. Universitat de València. 2002.

Serrano R, Portolés T, Blanes M A, Hernández F, Navarro J C, Varó I *et al.*, Characterization of the organic contamination pattern of a hyper-saline ecosystem by rapid screening using gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Sci Total Environ.* 2012; (433):161-168.

Solé M, Varó I, González-Mira A, Torreblanca A. Xenobiotic metabolism modulation after long-term temperature acclimation in juveniles of *Solea senegalensis*. Mar Biol. 2015; (162):401-412.

Soni M G, Carabin I G, Burdock G.A. Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens). Food Chem Toxicol. 2005; 7 (43):985-1015.

Sukumaran S and Gran A. Multigenerational demographic responses of sexual and asexual *Artemia* to chronic genotoxicity by a reference mutagen. Aquat Toxicol. 2013; (144-145):66-74.

Teerlink J, Hering A S, Higgins C P, Drewes J E. Variability of trace organic chemical concentrations in raw wastewater at three distinct sewershed scales. Water Res. 2012; 10 (46):3261-3271.

Terasaki M, Abe R, Makino M, Tatarazako N. Chronic Toxicity of Parabens and Their Chlorinated By-Products in *Ceriodaphnia dubia*. Environ Toxicol. 2015; 664-673.

Terasaki M, Makino M, Tatarazako N. Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays. J Appl Toxicol. 2009; (29):242-247.

Tillner R, Assheuer T, Rennert B, Trubiroha A, Clemmesen C, Wuertz S. Evaluation of an improved RNA/DNA quantification method in a common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) larval feeding trial with *Artemia*, two nematodes (*Panagrellus redivivus* Linnaeus 1758), *Panagrolaimus* sp. Fuchs 1930) and dry feed. J Appl Ichthyol. 2015; (31):466-473.

Varó I, Navarro J.C, Nunes B, Guilhermino L. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. Aquaculture. 2007; (266):87-96.

Varó I, Redón S, Garcia R, Amat E M, Guinot F, Serrano R, *et al.* Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*. Aquat Toxicol. 2015; (161):208-220.

Varó I, Serrano R, Pitarch E, Amat F, López F J, Navarro J C. Bioaccumulation of Chlorpyrifos Through an Experimental Food Chain: Study of Protein HSP70 as Biomarker of Sublethal Stress in Fish. Arch Environ Con Tox. 2002; (42):229-235.

Vo T T, Jeung E-B. An Evaluation of Estrogenic Activity of Parabens Using Uterine Calbindin-D9k Gene in an Immature Rat Model. *Toxicol Sci.* 2009; (112):68-77.

Wang L, Wu Y, Zhang W, Kannan K. Characteristic Profiles of Urinary *p*-Hydroxybenzoic Acid and its Esters (Parabens) in children and Adults from the United States and China. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47 (4):2069-2076.

Yamamoto H, Tamura I, Hirata Y, Kato J, Kagota K, Katsuki S *et al.* Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach. *Sci Total Environ.* 2011; (410-411):102-111.

Yamamoto H, Watanabe M, Katsuki S, Nakamura Y, Moriguchi S, Nakamura Y *et al.* Preliminary ecological risk assessment of butylparaben and benzylparaben -2. Fate and partitioning in aquatic environments. *Environm Sci.* 2007; (14):97-105.