



Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Departamento de Anatomía Patológica, Biología Celular, Histología, Historia de la
Ciencia, Medicina Legal y Forense y Toxicología.

Área de Toxicología.

**TOXICIDAD DE LOS FÁRMACOS SIMVASTATINA Y
CARBAMAZEPINA ASOCIADOS A MICROPLÁSTICOS
EN ADULTOS DE *Artemia salina*.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Gestión Integral del Agua

Autora: Vanessa Aranda Quirós

Tutoras: M^a Gemma Albendín García

Juana M^a Arellano López

Puerto Real, 2 de diciembre de 2019

MÁSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DEL AGUA

Dña. **Juana M^a Arellano López** y Dña. **M^a Gemma Albendín García**, Directora/Tutora del Trabajo de Investigación de la alumna **Vanessa Aranda Quirós** en el **Curso 2018/19** da su Visto Bueno a la presentación de la Memoria del Perfil Investigador titulada: **Toxicidad de los fármacos simvastatina y carbamazepina asociados a microplásticos en adultos de *Artemia salina*.**

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en el Campus de Puerto Real a 2 de diciembre de 2019.

VºBº

VºBº

Fdo:.....

Fdo:.....

Puerto Real, 2 de diciembre de 2019

A mis abuelos, Rosario y José.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES.....	3
1.1.1. FÁRMACOS: SIMVASTATINA Y CARBAMAZEPINA.....	4
1.1.2. MICROPLÁSTICOS: CLORURO DE POLIVINILO.....	6
1.2. ENZIMAS COLINESTERASAS.....	7
1.3. <i>ARTEMIA SALINA</i>	9
2. ANTECEDENTES.....	11
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. GENERAL.....	15
3.2. ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	15
4.2. COMPUESTOS QUÍMICOS.....	16
4.3. ENSAYO DE INGESTIÓN DE MICROPLÁSTICOS.....	16
4.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD.....	17
4.4.1. ENSAYO CON TÓXICO DE REFERENCIA (DICROMATO POTÁSICO). DETERMINACIÓN DE LA CL ₅₀	17
4.4.2. ENSAYOS CON FARMACOS (SIMVASTATINA Y CARBAMAZEPINA) Y MICROPLÁSTICOS. DETERMINACIÓN DE LA CL ₅₀	18
4.5. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	20
4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA.....	21
4.7. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	23
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. ENSAYOS DE INGESTIÓN DE MICROPLÁSTICOS.....	24
5.3. ENSAYO CON TÓXICO DE REFERENCIA (DICROMATO POTÁSICO)...	30
5.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD CON FÁRMACOS (SIMVASTATINA Y CARBAMAZEPINA) Y MICROPLÁSTICOS.....	31
5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA PRESENTE EN <i>ARTEMIA SALINA</i>	35
6. DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES.....	41
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42

ANEXO I.....	51
ANEXO II	52

RESUMEN

La contaminación producida por compuestos farmacéuticos y microplásticos, es un problema ambiental que se extiende por todos los ecosistemas acuáticos, representando un riesgo ignorado hasta hace relativamente poco tiempo. Los efectos que los fármacos pueden producir en los organismos que habitan estos ecosistemas, son en su mayoría desconocidos debido a la falta de estudios. Los microplásticos pueden tener efectos directos sobre los organismos, pero también pueden actuar como vectores de otros contaminantes, modificando potencialmente su toxicidad y biodisponibilidad. Por esto, el principal objetivo de este trabajo fue investigar si la presencia de microplásticos (cloruro de polivinilo) en el medio acuático, variaba la toxicidad producida por dos de los fármacos actualmente más consumidos, la simvastatina y la carbamazepina, en ejemplares adultos de *Artemia salina*.

Se realizaron ensayos de toxicidad aguda, con una duración de 48 horas y renovación del medio cada 24 horas, en los que se expuso a los organismos a diferentes concentraciones de los fármacos, así como a la mezcla de estos con microplásticos. Finalizados los ensayos, se calculó la CL_{50} de cada sustancia y se midió la actividad enzimática colinesterasa (biomarcador) para evaluar y determinar los efectos producidos en los organismos, tras su exposición a los contaminantes. Los valores obtenidos de CL_{50} fueron: 9,35 mg/L para la simvastatina, 10,30 mg/L para la simvastatina asociada a microplásticos, 43,23 mg/L para la carbamazepina y 46,50 mg/L para la carbamazepina asociada a microplásticos. Los resultados obtenidos indican que la presencia en el medio de microplásticos, disminuyó levemente la toxicidad de ambos fármacos.

Los datos de actividad enzimática colinesterasa obtenidos tras la exposición a simvastatina, no mostraron la disminución de dicha actividad, obteniéndose idéntico resultado en el caso de la simvastatina asociada a microplásticos. Por el contrario, la exposición tanto a carbamazepina como a carbamazepina asociada a microplásticos provocó la inhibición de la actividad colinesterasa, demostrando su efecto neurotóxico.

ABSTRACT

Pollution caused by pharmaceutical and microplastic compounds is an environmental problem that spreads throughout all aquatic ecosystems, representing a risk ignored until relatively recently times. The effects that drugs can produce on the organisms that inhabit these ecosystems are mostly unknown due to the lack of studies. Microplastics can have direct effects on organisms, but they can also act as vectors of other contaminants, potentially modifying their toxicity and bioavailability. For this reason, the main objective of this work was to investigate whether the presence of microplastics (polyvinyl chloride) in the aquatic environment varied the toxicity produced by two of the currently most used drugs, simvastatin and carbamazepine, in adult specimens of *Artemia salina*.

Acute toxicity tests were carried out, with a duration of 48 hours and renewal of the medium every 24 hours, in which the organisms were exposed to different concentrations of the drugs, as well as to the mixture of these with microplastics. After the tests, the LC₅₀ of each substance was calculated and cholinesterase enzymatic activity (biomarker) was measured to evaluate and determine the effects produced in organisms, after exposure to contaminants. The values obtained from LC₅₀ were: 9,35 mg/L for simvastatin, 10,30 mg/L for simvastatin associated with microplastics, 43,23 mg/L for carbamazepine and 46,50 mg/L for carbamazepine associated with microplastics. The results obtained indicate that the presence in the medium of microplastics, slightly decreased the toxicity of both drugs.

The enzymatic cholinesterase activity data obtained after exposure to simvastatin did not show a decrease in this activity, obtaining the same result in the case of simvastatin associated with microplastics. On the contrary, exposure to both carbamazepine and carbamazepine associated with microplastics caused the inhibition of cholinesterase activity, demonstrating its neurotoxic effect.

Palabras clave: microplásticos, simvastatina, carbamazepina, colinesterasas, *Artemia salina*.

Keywords: microplastics, simvastatin, carbamazepine, cholinesterases, *Artemia salina*.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES.

Los contaminantes emergentes son sustancias de diferente origen y naturaleza química, que han sido detectadas en el medio ambiente a niveles apreciables. La presencia de estos contaminantes en el medio ambiente no es nueva, pero si lo es la preocupación por los posibles efectos que pueden causar. Esto se debe a los avances tecnológicos, que han permitido desarrollar técnicas más sensibles de análisis, como la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS), detectándose estos contaminantes en concentraciones significativamente más altas de lo esperado.

Actualmente, la mayoría de contaminantes emergentes no se encuentran legislados, pero son objeto de ser incluidos en futuras regulaciones, en función de los resultados que arrojen las investigaciones sobre sus posibles efectos en la salud y el medio ambiente, así como de su mayor o menor presencia en aguas residuales, ríos y otras corrientes de agua. Se desconocen la incidencia, la evaluación de riesgos y los datos ecotoxicológicos de estos contaminantes, siendo difícil predecir los efectos que pueden producir en los seres humanos y los organismos acuáticos (Barceló, 2003).

Debido a su importancia, estos contaminantes se encuentran dentro de las líneas de investigación prioritarias, de los organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Comisión Europea y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA).

Se consideran contaminantes emergentes a una amplia gama de productos de uso habitual, tanto doméstico como industrial o agrícola, como son: pesticidas, tensioactivos, productos de higiene personal, antisépticos, retardantes de llamas, subproductos de desinfección, aditivos de gasolina, fármacos, metabolitos y/o productos de degradación de las sustancias anteriores (Kümmerer, 2011) y plásticos (Welden, 2019).

Los que demandan una mayor y urgente atención, debido a la escasez de datos que se tienen sobre ellos, así como por su cada vez mayor consumo y, en consecuencia, presencia en el medio ambiente, son los fármacos y los plásticos, motivos por los que serán investigados en este Trabajo de Fin de Máster.

1.1.1. FÁRMACOS: SIMVASTATINA Y CARBAMAZEPINA.

Los fármacos (o principios activos) son sustancias químicas naturales o sintéticas, con composición perfectamente conocida y capacidad de producir alteraciones en una determinada propiedad fisiológica del organismo que las ingiere.

Dentro de los fármacos de uso humano, dos de los más consumidos en España durante 2018, han sido el hipolipemiente simvastatina y el anticonvulsivo carbamazepina, ambos incluidos en la 21ª Lista Modelo de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud, por considerarse fármacos imprescindibles para cubrir las necesidades médicas prioritarias (WHO, 2019).

La simvastatina (Figura 1) es un fármaco hipolipemiente perteneciente a la familia de las estatinas. Actúa como un potente inhibidor competitivo de la hidroximetil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (coenzima limitante de la velocidad de síntesis del colesterol), lo que reduce la absorción de colesterol a través de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y provoca la disminución del colesterol en plasma. Debido a esta capacidad, la simvastatina se emplea en humanos para regular los niveles anormales de colesterol, triglicéridos y otros tipos de anomalías del metabolismo de lípidos, y para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular (Faggiotto y Paoletti, 1999).

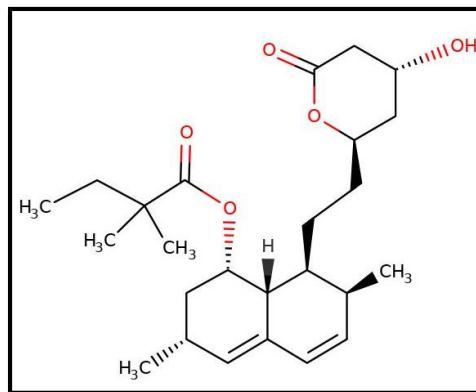


Figura 1: estructura química de la simvastatina (Fuente: TOXNET, 2017a).

Este fármaco se comercializa en comprimidos orales, siendo la simvastatina un polvo cristalino de color blanco, con un coeficiente de partición octanol/agua de 4,68 y una solubilidad en agua de 30µg/L (Chen *et al.*, 2002).

Se administra como un derivado de lactona inactivo activándose, a su forma de metabolito activo β-hidroxiácido, mediante un proceso de hidrólisis realizado por

enzimas carboxilesterasas inespecíficas en el intestino, el hígado y el plasma (Tubic-Grozdanis *et al.*, 2008). Después de una dosis oral de simvastatina, siendo la mínima recomendada de 40-80 mg/día en adultos, el 13% se excreta en la orina y el 60% en las heces, como sustancia químicamente activa o metabolito, pasando así a formar parte de las aguas residuales urbanas como contaminante (RxList, 2019).

Dentro de los fármacos antiepilépticos, la carbamazepina es uno de los más utilizados. La carbamazepina (Figura 2) es un anticonvulsivo y analgésico que se usa para controlar los trastornos convulsivos, el dolor neuropático y los síntomas de la bipolaridad y la esquizofrenia. Se metaboliza mayoritariamente en el hígado, por acción de la enzima CYP3A4, dando lugar a su metabolito activo carbamazepina-10,11-epóxido. Se comporta como un inhibidor de la activación de los canales de sodio, lo que produce la estabilización de las membranas excitables y determina la inactivación de las descargas de alta frecuencia en los focos epilépticos, con interrupción mínima del tránsito neuronal normal (Yoshimura *et al.*, 1998).

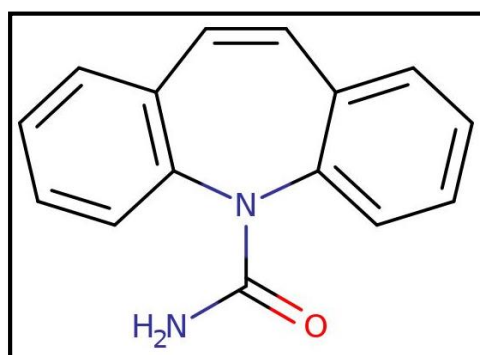


Figura 2: estructura química de la carbamazepina (TOXNET, 2017b)

La carbamazepina es un polvo de color blanco a blanquecino, con coeficiente de partición octanol/agua de 2,45 y solubilidad en agua 18 mg/L a 25 °C de temperatura (PubChem, 2005).

Después de la administración oral de una dosis de carbamazepina, mínima efectiva de 800-1200 mg/día para adultos, el 72% se excreta a través de la orina y el 28% en las heces, en forma de metabolitos hidroxilados y conjugados, permaneciendo solo el 3% de la dosis de carbamazepina inalterada (RxList, 2018).

1.1.2. MICROPLÁSTICOS: CLORURO DE POLIVINILO.

Los plásticos son polímeros procedentes del petróleo, combinados con otras sustancias aditivas, durante el proceso de fabricación, adquieren las propiedades deseadas en cuanto a textura, maleabilidad, resistencia, durabilidad, permeabilidad, color, etc. Las diferentes mezclas posibles entre estos compuestos y los diferentes aditivos, dan lugar a multitud de tipos de plástico cada uno de ellos con sus características correspondientes. Los tipos de plásticos más demandados por los transformadores en productos, de materias primas plásticas, han sido el polipropileno, polietileno de alta y baja densidad y el cloruro de polivinilo (PVC), suponiendo estos el 19,7%, 19% y 10%, respectivamente, del total de plásticos demandados (Plastics Europe, 2019).

Los microplásticos (Figura 3), son pequeñas partículas de plástico con un tamaño inferior a los cinco milímetros. En función de su origen, los microplásticos se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los microplásticos primarios son aquellos que se fabrican con un tamaño inferior a cinco milímetros, con el fin de ser utilizados en productos de cuidado personal, como los exfoliantes (Napper *et al.*, 2015), o como pellets de plástico virgen, destinados a ser materias primas para la fabricación de productos plásticos de mayor tamaño (Mato *et al.*, 2001). Mientras que los microplásticos secundarios, son aquellos derivados de la fragmentación de plásticos de mayor tamaño por diferentes procesos, como la meteorización física por la acción del oleaje, la biodegradación, la fotodegradación, la hidrólisis y la termooxidación (Andrady, 2011).



Figura 3: microplásticos primarios de PVC (Fuente: elaboración propia).

En el presente trabajo, se investigarán los efectos toxicológicos que produce la asociación de los fármacos simvastatina y carbamazepina con PVC.

El PVC, compuesto de cloro (57%) y petróleo o gas (43%), se ha convertido en las últimas décadas en uno de los plásticos más utilizados debido a sus propiedades. Su bajo coste, excelente capacidad de procesamiento y alta durabilidad, han hecho que el PVC sea en la actualidad el material elegido por muchas industrias para fabricar todo tipo de productos dirigidos a múltiples aplicaciones como: marcos de ventanas, piscinas, tuberías, revestimientos, aislantes, envases de medicamentos y alimentos, cables, guantes quirúrgicos, calzado, entre otros (ECVM, 2019).

1.2. ENZIMAS COLINESTERASAS.

Las enzimas colinesterasas son un biomarcador muy utilizado para estimar y valorar los efectos producidos en los organismos, tras su exposición a sustancias ambientales contaminantes. Las colinesterasas (ChEs) pertenecen a la familia de las esterasas, caracterizándose por su capacidad de catalizar reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos y distinguiéndose de otras esterasas por presentar mayor afinidad a hidrolizar los ésteres de colina. Se inhiben en presencia de fisostigmina o eserina, a concentraciones situadas en el rango de 10^{-5} M (Eto, 1974).

Las ChEs están presentes tanto en organismos vertebrados como invertebrados. En vertebrados, según su predilección por determinados sustratos, vulnerabilidad a inhibidores específicos y cualidades catalíticas, se pueden clasificar en dos tipos, la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa. La acetilcolinesterasa (AChE), o colinesterasa específica, se localiza principalmente en el tejido nervioso y, en menor medida, en eritrocitos, ganglios y músculos (Sturm *et al.*, 1999). La butirilcolinesterasa (BChE), o colinesterasa no específica, se encuentra principalmente en el hígado páncreas y plasma sanguíneo (Eto, 1974; Thompson y Walker, 1992).

En invertebrados, su clasificación no está del todo definida debido a que presenta preferencia parcial por los sustratos, y no responde según lo esperado ante los inhibidores específicos. Diversos autores han demostrado que la actividad colinesterasa presente en invertebrados, como *Palaemonetes pugio*, *Biomphalaria glabrata*, *Lumbriculus variegatusse* y *Penaeus monodon*, se debe principalmente, a la acetilcolinesterasa (Fulton y Key, 2002; Kristoff *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010; Thi *et al.*, 2019). No obstante, las

enzimas colinesterasas de otros organismos como *Artemia parthenogenetica*, *Maia verrucosa*, *Palinurus vulgaris* y *Potamopyrgus antipodarum*, muestran características intermedias entre las dos formas de colinesterasas, por lo que no pueden clasificarse como acetilcolinestesa ni butirilcolinesterasa (Talesa *et al.*, 1992; Varó *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2008).

Conocer el tipo de ChE presente en las diferentes especies, es fundamental para poder realizar una correcta medida de la actividad colinesterasa, ya que permite elegir el sustrato, el inhibidor y las concentraciones correctas.

AChE y BChE se distinguen por tener distintos sustratos específicos así como distinta sensibilidad hacia ciertos inhibidores. AChE hidroliza el sustrato a alta velocidad cuando este es acetilcolina y a menor velocidad cuando es propionilcolina o butirilcolina. Su inhibición se produce con altas concentraciones de sustrato o con BW284C51 (1,5-bis-(4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-uno dibromuro). BChE hidroliza a alta velocidad cuando el sustrato es butirilcolina y propionilcolina. Se inhibe a bajas concentraciones de iso-OMPA (tetraisopropilo pirofosforamida) (Eto, 1974).

La AChE desempeña una labor esencial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Su función es hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina durante la sinapsis, produciendo colina y ácido acético, precursores de sus síntesis. Se encuentra principalmente en las uniones neuromusculares y las sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso central, donde su actividad sirve para terminar la transmisión sináptica. Debido a su capacidad de hidrolizar acetilcolina a nivel sináptico, estas enzimas tienen una función esencial para la transmisión del impulso nervioso tanto en el sistema nervioso central como periférico. La inhibición de la actividad enzimática colinesterasa, produce una acumulación excesiva de acetilcolina en el espacio intersináptico, provocándose una sobreestimulación nerviosa y, en consecuencia, la parálisis del sistema neural y muscular, debido a la incorrecta transmisión del impulso nervioso. Esta alteración en el sistema nervioso, produce a los organismos anomalías en los estímulos musculares, glandulares e incluso la muerte (Jeyaratnam y Maroni, 1994).

La BChE no tiene función fisiológica conocida, debido a que, aunque se le han atribuido muchas capacidades, como ser precursora de la AChE, ninguna ha podido ser demostrada con claridad (Witter, 1963).

Debido a la esencial función que desempeña en los organismos, su presencia en especies de todo tipo y su sensibilidad a múltiples contaminantes, el potencial de inhibición de la actividad colinesterasa se ha empleado tradicionalmente como criterio para evaluar la toxicidad de organofosforados, carbamatos, detergentes, surfactantes, metales y fármacos (Guilhermino *et al.*, 2000; Schreck *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2019)

1.3. ARTEMIA SALINA.

La *Artemia salina* (Linnaeus, 1758), es un crustáceo perteneciente al género *Artemia*, clase *Branchiopoda*, familia *Artemiidae* y orden *Anostraca* (WoRMS, 2019).

El género *Artemia* (Leach, 1819), está formado por varias especies que se reproducen sexualmente, así como por varias poblaciones que lo hacen de forma partenogenética. Se diferencian seis especies bisexuales, *Artemia salina*, distribuida por Europa y África, *Artemia urmiana*, presente en el Lago Urmia (Irán) y en Crimea (Ucrania), *Artemia sinica*, autóctona de zonas de China continental y Mongolia, *Artemia tibetiana*, localizada únicamente en el Tibet, *Artemia persimilis*, endémica de América y *Artemia franciscana*, perteneciente a América del Sur. Las poblaciones partenogenéticas se agrupan en una única especie, *Artemia parthenogenetica*, distribuida por Europa, Asia y África (FAO, 2019).

Los ejemplares adultos de *Artemia* se caracterizan por presentar un cuerpo segmentado, aparato digestivo lineal y apéndices funcionales, en forma de hoja, llamados toracópodos. El cuerpo está cubierto por un exoesqueleto de quitina fina y flexible, que se renueva periódicamente (muda), permitiendo su crecimiento. Se divide en cabeza, tórax y abdomen. La cabeza presenta cinco segmentos, donde se sitúan los ojos pedunculados, las antenas y las mandíbulas. El tórax está formado por once segmentos, cada uno con un par de toracópodos. El abdomen está compuesto de ocho segmentos, encontrándose en los dos anteriores los genitales y, en el final, la furca caudal bilobulada. Su talla alcanza los 12 mm de longitud en las poblaciones bisexuales, y hasta los 20 mm en las partenogenéticas. Presentan dimorfismo sexual, los machos (Figura 4. A), tienen las segundas antenas hipertrofiadas en forma de tenazas (claspers) y dos aparatos reproductores retráctiles situados en los segmentos genitales, mientras que las hembras (Figura 4. B), presentan un saco ovígero y las segundas antenas filiformes (FAO, 2019).



Figura 4: imagen al microscopio óptico de *Artemia salina* con un aumento de 40x. A: macho, en el que se observan las antenas en forma de tenaza. B: hembra, en la que se aprecian las antenas filiformes y el saco ovífero (Fuente: elaboración propia).

La reproducción de *Artemia* puede ser de dos tipos, siendo ambas excluyentes: zigogénica (con presencia de hembras y machos, y fertilización de los huevos) o partenogénica (con presencia de hembras y sin fertilización). Además, presentan dos estrategias reproductivas: ovoviviparismo, con liberación de nauplios que completan su desarrollo en el interior del saco ovífero, y oviparismo, deteniéndose el desarrollo de los embriones en un estadio temprano, cubriéndose de una cubierta protectora resistente y quedando en forma de quiste. En condiciones adversas para su supervivencia, *Artemia* opta por la reproducción ovípara, quedando los embriones enquistados en estado de diapausa, hasta que las condiciones ambientales son favorables para su supervivencia. Para su eclosión, los quistes deben ser activados mediante un proceso de deshidratación previa, siendo posteriormente rehidratados en agua de baja salinidad, en condiciones adecuadas de iluminación y aireación. Esta capacidad de formar quistes, asegura la persistencia de la población, al ser estructuras protectoras con elevada resistencia a las condiciones ambientales adversas, como las temperaturas extremas (Clegg *et al.*, 2001).

El ciclo biológico de *Artemia* comienza con el desarrollo del embrión en el saco ovífero o quiste, hasta su eclosión en forma de nauplio o estado larvario I, completamente formado. Durante este estado larvario se alimentan de las reservas vitelinas, pues su

aparato digestivo aún no es funcional. Después de la primera muda, pasa al estado larvario II, en el que comienza a capturar alimento externo. La larva continúa su crecimiento apareciendo diferenciaciones a lo largo de quince mudas, pasando por diferentes fases metanaupliares, hasta alcanzar su etapa adulta. En las condiciones adecuadas, esta especie puede vivir varios meses, creciendo de nauplio a adulto en 8 días y reproduciéndose en una tasa de 300 nauplios o quistes cada 4 días (FAO, 1986).

Artemia salina es un filtrador pasivo y no selectivo, capaz de ingerir partículas de entre 1 y 50 μm de tamaño (Gelabert, 2001). Captura las partículas alimenticias mediante el movimiento regular de sus apéndices, creando corrientes de agua que las arrastran hacia su boca. Se alimenta de bacterias, pequeños protozoos, algas unicelulares halófilas y detritos finos que encuentra en el medio acuático donde habita. Se localiza exclusivamente en ecosistemas hipersalinos (salinas, lagunas y lagos salados situados en zonas costeras), caracterizados por tener una elevada productividad, escasa diversidad biológica y relaciones tróficas sencillas, con apenas presencia de depredadores. Su capacidad de colonizar estos ecosistemas, se debe al desarrollo de mecanismos, fisiológicos y bioquímicos, que le permiten tolerar un amplio rango de variaciones ambientales como, bajos niveles de oxígeno disuelto, salinidades de entre 45 g/L y 370 g/L y temperatura de entre 5 y 35° C (Kappas *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES.

En la actualidad la principal fuente de contaminación ambiental es la actividad humana. Las actividades urbanas, industriales y agropecuarias, generan una gran cantidad de contaminantes emergentes, como fármacos y microplásticos, que son vertidos al medio ambiente sin ningún tipo de control, donde causan efectos nocivos a los organismos que lo habitan.

El consumo de fármacos, de uso humano, se ha incrementado significativamente a lo largo de los años debido a numerosos factores. El aumento de la esperanza de vida, el consecuente envejecimiento de la población, las enfermedades crónicas, la automedicación, etc., han provocado que el consumo de fármacos se estime en toneladas al año (AEMPS, 2019). Este elevado consumo ha provocado que la cantidad de estos compuestos que se vierte al medio marino sea cada vez mayor. En consecuencia, la presencia de fármacos y sus metabolitos en las diferentes masas de agua, ha sido

confirmada por diversos autores, como Liu *et al.* (2011), Biel-Maeso *et al.* (2018), Barbosa *et al.* (2019) y Primrose *et al.* (2019), habiéndose detectado en aguas subterráneas, lagos, ríos, océanos, etc., gran cantidad de analgésicos, antibióticos, esteroides, anticonceptivos, hipolipemiantes, anticonvulsivos, etc.

La simvastatina y la carbamazepina son dos de los fármacos que se ha demostrado que alcanzan en el medio acuático concentraciones cada vez más elevadas. Esto se debe al incremento progresivo de su consumo que se está produciendo en las últimas décadas. La simvastatina es actualmente el fármaco hipolipemiante más consumido en España, habiéndose incrementado un 670% desde el año 2000 (AEMPS, 2014). Del mismo modo, la carbamazepina es el anticonvulsivo más utilizado, con un crecimiento de consumo del 41,52% desde 2008 (AEMPS, 2017).

Este crecimiento en el consumo de ambos fármacos, su posterior descarga a las aguas residuales urbanas, mediante las excreciones humanas, los restos de fármacos que no se eliminan adecuadamente y los desechos generados durante su fabricación, provocan que grandes cantidades de fármacos y sus metabolitos lleguen a las estaciones de agua residuales (EDARs), donde no se eliminan por completo durante los procesos de tratamiento. Debido a su alto coste, la mayoría de EDARs no cuentan con sistemas de depuración capaces de eliminar totalmente los compuestos farmacéuticos, vertiéndose el efluente manteniendo altas concentraciones de estos productos a los ecosistemas acuáticos, donde pueden causar efectos tóxicos a los organismos (Hernando *et al.*, 2006).

La capacidad de los compuestos farmacéuticos para provocar alteraciones en los organismos acuáticos ha sido investigada por numerosos autores. En el fármaco simvastatina, ensayos *in vivo* realizados por Nueparth *et al.* (2014), tuvieron como resultado que la exposición a simvastatina interrumpe la reproducción y el crecimiento del crustáceo anfípodo *Gammarus locusta*. Investigaciones realizadas *in vitro* también demostraron que este compuesto, tanto en su forma inalterada como su metabolito, causa citotoxicidad hepática en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), siendo determinada como la inhibición metabólica y la pérdida de integridad de la membrana celular (Ellesat *et al.*, 2010). En el caso de la carbamazepina, se ha demostrado que produce efectos nocivos en los organismos, como la inhibición de la muda y el crecimiento en el crustáceo *Eriocheir sinensis* (Chen *et al.*, 2019), malformaciones durante el desarrollo embrionario en *Mytilus galloprovincialis* (Franzellitti *et al.*, 2019), así como efectos neurotóxicos,

como alteraciones en la movilidad y en el comportamiento en embriones de *Dario rerio* (Weichert *et al.*, 2017).

Los microplásticos son otros de los contaminantes emergentes que están ganando relevancia en los últimos años, siendo objeto de investigación de numerosos autores su presencia en el medio acuático, caracterización, distribución y posibles efectos sobre los organismos (ANEXO I).

Debido a su bajo coste y versatilidad, los plásticos son cada vez más demandados, habiendo sustituido a los materiales convencionales como el papel, el vidrio, la madera, el metal, etc. En 2018 la producción de plásticos a nivel mundial alcanzó las 360 millones de toneladas, mientras que en Europa, la producción de plástico se situó en 62 millones de toneladas. La cantidad de plásticos generados en el mundo crece exponencialmente desde hace décadas, cifrándose este aumento de 348 a 359 millones de toneladas durante el periodo 2017-2018 (Plastic Europe, 2019).

Algunos productos plásticos tienen una vida útil inferior a un año, mientras que otros tienen una durabilidad superior a 50 años, pero teniendo todos en común que, una vez finalizada su vida útil, se convierten en residuos. La eliminación de muchos de estos residuos plásticos no se gestiona adecuadamente, por lo que acaban contaminando ecosistemas acuáticos (Lestari y Trihadiningrum, 2019) en forma de basura marina.

Aunque hay muchos tipos de basuras marinas (papel, vidrio, metal, etc.), los plásticos representan el 82% de esta basura (Deudero y Alomar, 2015). Esta basura plástica puede clasificarse, en función de su tamaño, en macroplásticos y microplásticos, perteneciendo a estos últimos, la mayor parte de la basura total liberada al medio marino.

Como ocurre con los fármacos, los microplásticos originados por la actividad humana en forma de fibras textiles, restos de cosméticos y de procesos industriales, acaban en la red de alcantarillado y llegan al medio marino a través de los efluentes de las EDARs, donde no se eliminan por completo (Magni *et al.*, 2019).

Elevadas cantidades de microplásticos se ha detectado en estuarios (Zhang *et al.*, 2019), ríos (Yan *et al.*, 2019), océanos (Pan *et al.*, 2019) o lagos (Sighicelli *et al.*, 2018) donde suponen una amenaza para los organismos acuáticos ya que, al no degradarse, persisten en la columna de agua y en los sedimentos, aumentando progresivamente su concentración y su biodisponibilidad. También pueden actuar como vectores para el

transporte de otros contaminantes, ya que presentan aditivos en su composición que pueden ser liberados al medio durante los procesos de fragmentación, y poseen la capacidad de adsorber otros compuestos químicos contaminantes en su superficie como, metales pesados (cobre, plomo, zinc, etc.), contaminantes orgánicos hidrófobos o compuestos farmacéuticos (Li *et al.*, 2018).

De esta capacidad de los microplásticos de actuar como vectores de otros contaminantes, deriva la importancia de investigar la interacción que se produce entre microplásticos y fármacos, al estar ambos contaminantes cada vez más presentes en los ecosistemas acuáticos. Autores, como Rainieri *et al.* (2018), han demostrado que la presencia de microplásticos en el medio varía la toxicidad de otras sustancias contaminantes, como podría ocurrir con los fármacos simvastatina y carbamazepina.

La idoneidad de elegir la inhibición de la actividad colinesterasa como biomarcador de exposición de crustáceos a estos contaminantes, ha sido confirmada por varios autores. En crustáceos, Thi *et al.* (2019) demostró que la actividad colinesterasa presente en ejemplares adultos de *Penaeus monodon*, se veía inhibida por la acción de antibióticos. Otro ensayo realizado por Nunes *et al.* (2016), concluyó que el ansiolítico diazepam inhibe la actividad colinesterasa presente en *Artemia parthenogenetica*. Del mismo modo, Yu *et al.* (2018), han determinado en sus investigaciones que los microplásticos disminuyen significativamente la actividad colinesterasa en *Eriocheir sinensis*.

Los crustáceos son organismos muy adecuados para la realización de estos ensayos de toxicidad, debido son uno de los taxones que más microplásticos pueden ingerir, al basarse la alimentación de algunas de sus especies, como *Artemia salina*, en la filtración no selectiva. La utilización *Artemia salina* en los ensayos de toxicidad tiene como ventajas, en comparación con los peces y moluscos, su ciclo de vida más corto, disponibilidad inmediata de poblaciones uniformes, método estandarizado de cultivo a partir de quistes desecados y fácil manejo. Por todo esto, *Artemia salina* se ha empleado con éxito en ensayos toxicológicos desde hace décadas (Migliore, *et al.*, 1997).

3. OBJETIVOS.

3.1. GENERAL.

El objetivo principal de este trabajo es determinar si la presencia de microplásticos, cloruro de polivinilo, en el medio acuático, afecta a la toxicidad de los fármacos simvastatina y carbamazepina.

3.2. ESPECÍFICOS.

- Comprobar que los ejemplares adultos de *Artemia salina* ingieren los microplásticos presentes en el medio a diferentes concentraciones.

- Determinar la toxicidad aguda, tras 48 horas de exposición, a los fármacos simvastatina y carbamazepina, en ensayos independientes realizados con ejemplares adultos de *Artemia salina*. Comprobar si la asociación de los microplásticos con estos fármacos varía su toxicidad.

- Investigar el efecto de los fármacos, simvastatina y carbamazepina, sobre la actividad enzimática colinesterasa presente en *Artemia salina*, tanto en solitario como asociados a microplásticos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

En la realización de los ensayos se emplearon ejemplares adultos, con tres semanas de vida, de la especie *Artemia salina* que fueron suministrados por el Servicio de Cultivos Marinos de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz con número de registro CA/3/U en la Sección de Establecimiento Usuario y CA/3/CS en la Sección de Establecimiento de Cría y Suministro de Animales de Experimentación de la Comunidad Autónoma de Andalucía. Igualmente, proporcionaron el agua de mar que se utilizó en los ensayos.

4.2. COMPUESTOS QUÍMICOS.

- Acetona grado analítico (CAS N° 67-64-1 de Scharlau).
- Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) (CAS N° 9-78-3 de Merck).
- Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Bio-Rad).
- Bio-Rad Protein Assay (Dye Reagent concentrate) (Bio-Rad).
- Carbamazepina (CAS N° 298-46-4 de Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Cloruro de polivinilo de bajo peso molecular (PVC) (CAS N° 9002-86-2 densidad 1,4 g/ml de Aldrich).
- Dicromato potásico purísimo (K₂Cr₂O₇) (CAS N° 7778-50-9 de Panreac).
- Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (CAS N° 7558-79-4 de Merck).
- Simvastatina (CAS N° 79902-63-9 de Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Sodio dihidrógeno fosfato monohidrato (CAS N° 10049-21-5 de Merck).
- Yoduro de acetiltiocolina 98% (ASCh) (CAS N° 2260-50-6 de Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).

4.3. ENSAYO DE INGESTIÓN DE MICROPLÁSTICOS.

Para comprobar si los microplásticos eran ingeridos por los organismos, se realizó un ensayo previo de ingestión. Se expusieron 10 ejemplares adultos de *Artemia salina* a concentraciones de 0,26 mg/L, 0,69 mg/L y 1,6 mg/L de cloruro de polivinilo, en 20 ml de agua de mar. Estas concentraciones se seleccionaron en función de los resultados obtenidos por otros autores en estudios previos con microplásticos (Luís *et al.*, 2015; Barboza *et al.*, 2018). Se realizaron tres réplicas de cada concentración, así como de un control de agua de mar.

Trascurridas las 48 horas de duración del ensayo, se llevó a cabo el análisis visual del aparato digestivo de los organismos expuestos a los microplásticos, con el fin de comprobar si había sido ingerido. Para ello, se colocaron en un portaobjetos, se fijaron con un cubreobjetos, y se observaron en el microscopio óptico con un objetivo de 40x y 100x aumentos.

4.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD.

4.4.1. ENSAYO CON TÓXICO DE REFERENCIA (DICROMATO POTÁSICO). DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀.

La concentración letal media (CL₅₀) es la concentración de una sustancia que produce la muerte del 50% de organismos expuestos a ella, durante un periodo de tiempo definido. Se emplea como un parámetro para determinar la toxicidad aguda de una sustancia.

Los ensayos de toxicidad tienen como objetivo evaluar los efectos que produce una determinada sustancia en un organismo. Consisten en exponer, en condiciones y tiempo controlados, los organismos a concentraciones crecientes de la sustancia para determinar los efectos que esta les produce.

La realización de un ensayo con un tóxico de referencia, del que se conoce el efecto a una serie de dosis predeterminadas, se utiliza para establecer la sensibilidad de las especies y evaluar la calidad de la población. Permite aceptar o rechazar los organismos de la población que se van a emplear en los posteriores ensayos, según la respuesta de estos ante el tóxico de referencia. Asegura que la respuesta de la población de organismos expuestos al tóxico, se deba efectivamente al efecto de este y no a variaciones en los organismos.

En este trabajo se utilizó como tóxico de referencia el dicromato potásico (K₂Cr₂O₇). Se preparó una solución stock, disolviendo 0,1 g de K₂Cr₂O₇ en 10 mL de agua Milli-Q, a partir de la cual, se obtuvieron por dilución seriada en agua de mar, siete concentraciones nominales decrecientes del tóxico. Estas concentraciones fueron: 80 mg/L, 40 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2,5 mg/L y 1,25 mg/L.

Este ensayo se realizó en acuarios de vidrio con un volumen máximo de 25 mL, en cada uno de los cuales se añadieron 10 organismos y 20 mL de las distintas disoluciones realizadas con las concentraciones a ensayar. También se hizo un control con 20 mL de agua de mar. Durante el ensayo, los acuarios permanecieron tapados para evitar la evaporación del medio. Cada concentración y control se realizó por triplicado, utilizándose en total 24 acuarios y 240 ejemplares adultos de *Artemia salina*.

El ensayo tuvo una duración de 24 horas, durante las cuales no se alimentó a los organismos, realizándose en condiciones de 21°C de temperatura exterior y fotoperiodo

natural de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad. Finalizado el tiempo de ensayo, se cuantificaron los individuos vivos y muertos, siendo considerados como muertos aquellos que no presentaban ningún tipo de movimiento.

La tasa de mortalidad se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de mortalidad} = \frac{F_c}{P_c} \times 100$$

Dónde F_c es el número de organismos que han muerto en cada concentración y P_c es el total de organismos expuestos a dicha concentración.

4.4.2. ENSAYOS CON FÁRMACOS (SIMVASTATINA Y CARBAMAZEPINA) Y MICROPLÁSTICOS. DETERMINACIÓN DE LA CL_{50} .

Las concentraciones de simvastatina y carbamazepina utilizadas se seleccionaron después de la realización de varios ensayos previos, debido a la inexistencia de bibliografía donde se estudiaran estos fármacos en la especie *Artemia*. Para la simvastatina las concentraciones nominales elegidas fueron: 12,03 mg/L, 10,03 mg/L, 8,35 mg/L, 6,96 mg/L y 5,80 mg/L. Mientras que para la carbamazepina fueron: 52,08 mg/L, 43,40 mg/L, 36,17 mg/L, 30,14 mg/L y 25,16 mg/L. Se empleó una única concentración de microplástico de 0,26 mg/L, siendo esta elegida tras una revisión bibliográfica por considerarse ambientalmente relevante (Luís *et al.*, 2015).

Estas concentraciones se prepararon por dilución en agua de mar, a partir de soluciones stock de simvastatina y carbamazepina. Estas soluciones se prepararon disolviendo 20 mg de simvastatina en 10 mL de acetona y 50 mg de carbamazepina en 10 mL de acetona. Se utilizó la acetona como disolvente debido a la baja solubilidad de ambos compuestos en agua. En el caso del microplástico, se preparó una suspensión stock, añadiendo 26 mg de PVC en polvo a 10 mL de agua Milli-Q.

Se realizaron 4 ensayos semiestáticos de toxicidad, siendo estos:

1. Ensayo con simvastatina.
2. Ensayo con simvastatina y microplásticos.
3. Ensayo con carbamazepina.
4. Ensayo con carbamazepina y microplásticos.

En estos ensayos se expuso a ejemplares adultos de *Artemia salina* a las diferentes concentraciones de los fármacos empleados con microplásticos, o sin los microplásticos, durante 48 horas.

En los dos ensayos realizados únicamente con fármacos, se emplearon acuarios de vidrio de 25 mL de capacidad máxima, cinco concentraciones, un control con agua de mar y otro con acetona. Los otros dos ensayos, realizados con fármacos y microplásticos, se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento, incluyendo además un control con microplásticos. Se realizaron 3 réplicas de cada concentración y control (Figura 5 A).

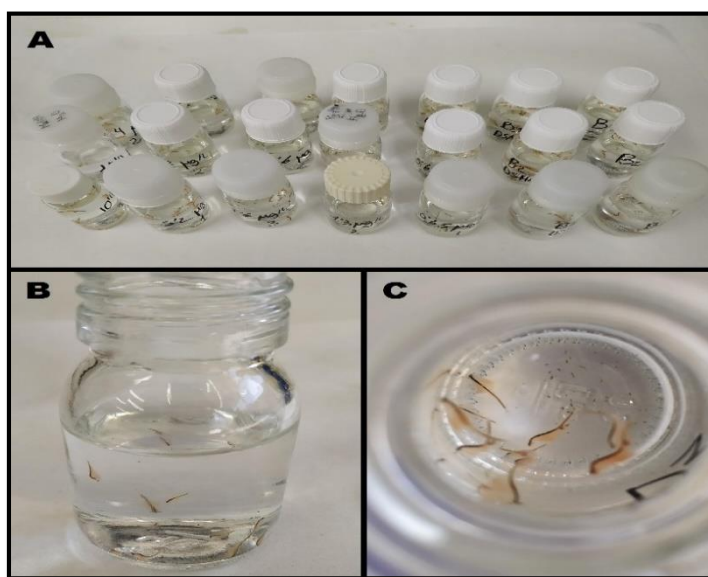


Figura 5: A: ensayo de toxicidad con simvastatina. B: acuario con *Artemia salina*. C: detalle del interior del acuario (Fuente: elaboración propia).

Los ensayos se realizaron siguiendo las directrices de la guía para la prueba de productos químicos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) número 202 (OCDE, 2004), evaluando la muerte/inmovilización de *Artemia salina*.

En cada acuario se añadieron 20 mL de disolución de la concentración correspondiente a ensayar y 10 ejemplares de *Artemia salina* (Figura 5 B y C), con cuatro semanas de vida y una talla aproximada de 8 mm. Además, en los ensayos con microplástico, se adicionaron 2 μ L de la suspensión stock de microplásticos, previamente agitada, resultado la concentración final de este en el acuario de 0,26 mg/L. Se mantuvieron tapados los acuarios durante los ensayos para evitar la evaporación del medio.

Se realizó una renovación de las disoluciones de los acuarios cada 24 horas. Además, para controlar las condiciones y la calidad del medio donde se encontraban los organismos, se midieron los siguientes parámetros físico-químicos en un acuario de cada concentración: pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura. Para la toma de medidas se empleó una sonda multiparamétrica HANNA HI 9829, previamente calibrada, tomándose estas justo antes de renovar las disoluciones de los acuarios (medio con 24 horas), e inmediatamente después de renovarlas (medio con 0 horas). Se realizó un examen visual diario de los individuos para controlar cualquier alteración que pudiera producirse.

Los ensayos se realizaron en condiciones controladas de entre 19 y 21°C de temperatura y fotoperiodo natural, 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad. Durante las 48 horas de duración de los ensayos, los organismos no recibieron alimento.

Finalizados los ensayos, se examinaron los organismos para comprobar su estado. Se contabilizaron los vivos y muertos/inmovilizados, considerándose muertos aquellos que no presentaban movimiento tras su estimulación con una varilla de vidrio y 1 minuto de observación. Los ejemplares de *Artemia salina* muertos se desecharon, mientras que los vivos se introdujeron en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se conservaron congelados a - 20°C hasta el momento de su análisis. Adicionalmente, antes de su conservación, los organismos vivos procedentes de los ensayos que incluían microplásticos, se observaron al microscopio óptico para comprobar si este había sido ingerido.

4.5. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras obtenidas en los ensayos de toxicidad previos fueron homogeneizadas. Este proceso se realizó en frío con un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax (Schott Ibérica, España) durante 1 minuto, a razón de 100 µl de tampón fosfato 0,1 M de pH 7,4 por cada *Artemia salina*. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm (9.000 x g) durante 30 minutos a 4°C de temperatura, en una centrifugadora con refrigeración modelo Heraeus Megafuge 1.0 R. Finalizado el centrifugado, el pellet obtenido se desechó, siendo el sobrenadante conservado en tubos Eppendorf de 1,5 ml para su inmediato análisis.

4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA.

La actividad colinesterasa presente en los ejemplares de *Artemia salina* se midió aplicando el método de Ellman (1961), modificado para microplacas por Guilhermino *et al.* (1996). Esta actividad se midió empleando microplacas con 96 pocillos, en los cuales se añadieron 50 μ l de la muestra homogeneizada y 250 μ l de una mezcla de reacción que contenía el reactivo de Ellman (DTNB). Esta mezcla de reacción se preparó añadiendo 30 ml de tampón fosfato 0,1 M de pH 7,4, 1 ml de ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) y 200 μ l de acetiltiocolina (ASCh) 200 mM disuelta en agua ultrapura Milli-Q. Una vez mezclado el contenido en cada pocillo, se incubó durante 15 min en oscuridad (Varó *et al.*, 2015) y temperatura ambiente.

La velocidad de reacción enzimática se determinó empleando un lector de microplacas Bio-Rad, modelo BenchMark Plus (Figura 6), midiéndose la absorbancia a 415 nm durante 3 minutos cada 30 segundos. Cada una de las muestras, así como los controles, se midió por triplicado.

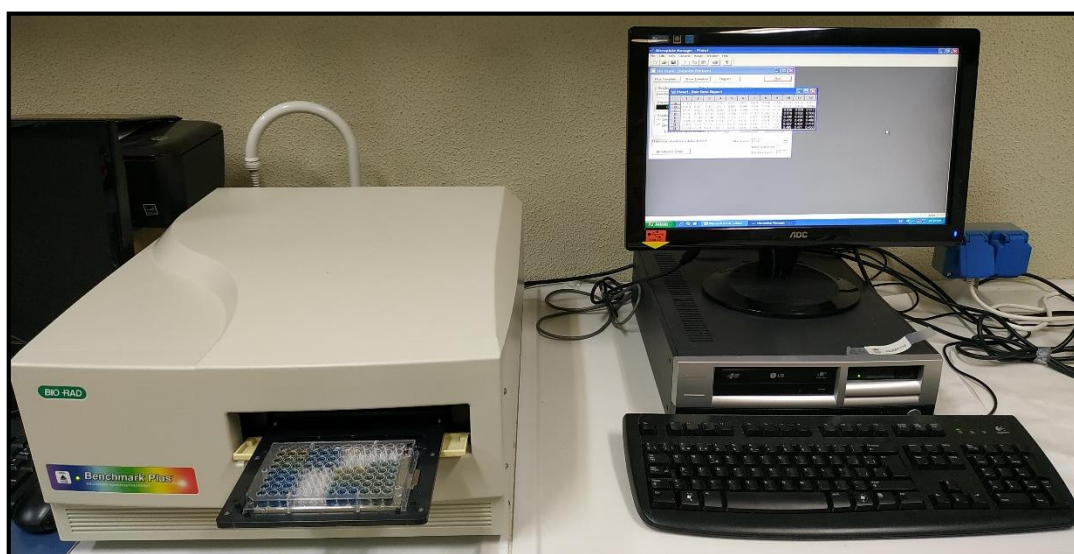


Figura 6: lector de microplacas empleado para la determinación de actividad colinesterasa y proteínas (Fuente: elaboración propia).

La actividad enzimática se mide siguiendo el aumento de color amarillo producido por el anión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB), formado a partir de la reacción que se produce entre la tiocolina y el DTNB. Esta reacción fue descrita por Ellman *et al.* (1961), como se representa en la figura 7.

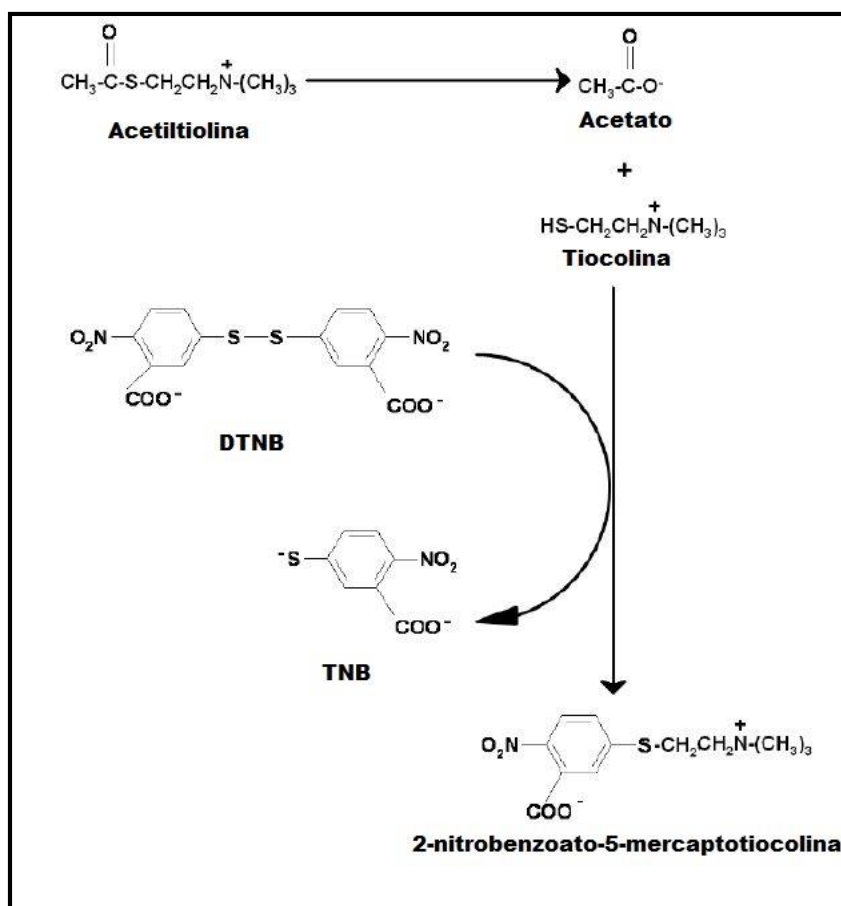


Figura 7: reacción descrita por Ellman *et al.*, (1961).

Se midieron dos blancos con cada experimento, siendo el primero un blanco sin muestra, en lugar de esta se añadieron 50 μl de tampón fosfato 0,1 M de pH 7,4, y el segundo un blanco sin sustrato en la mezcla reactiva, sustituyéndose este por 200 μl de tampón fosfato 0,1 M de pH 7,4. El primero de ellos se midió para calcular la velocidad de hidrólisis espontánea del sustrato, y el segundo para estimar la reacción que se produce entre los tioles y el DTNB. Posteriormente, los valores de ambos blancos se restaron a los obtenidos para cada muestra y el valor resultante se utilizó para realizar el cálculo de la actividad enzimática. Cada muestra se midió por triplicado y la actividad enzimática fue calculada a partir de la ecuación:

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

Dónde V es el volumen en ml de la mezcla en el pocillo, ϵ es el coeficiente de extinción molar del TNB ($13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d es el paso de luz en la microplaca (0,874 cm), v es el volumen de la muestra y $\Delta\text{DO}/\text{min}$ el incremento de densidad óptica por minuto.

La actividad específica se determinó a partir de la siguiente fórmula:

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

4.7. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976) adaptado a microplacas (método estándar de BioRad), utilizando para ello Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar. Este método se fundamenta en la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con las proteínas. El colorante presenta un color rojo (máxima absorción de 465 nm), cambiando a azul cuando se une con las proteínas (máxima absorción de 595 nm), y siendo un método muy reproducible y rápido.

Estos ensayos se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos, añadiendo 10 μ l de muestra o de patrón de proteínas (0, 0,0625, 0,125, 0,25 y 0,5 mg/ml de BSA) y 200 μ l de reactivo de Bradford, que se preparó mezclando una parte del reactivo comercial concentrado con cuatro partes de agua ultrapura Milli-Q. Se dejó reaccionar la mezcla de reactivo y muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm de cada una de las muestras, así como de un blanco de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), por triplicado.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los datos obtenidos se procesaron con diferentes programas informáticos. Los datos de mortalidad, obtenidos en los ensayos de toxicidad, se trataron con el programa de la Agencia Medio Ambiental de Estados Unidos (EPA-USA) para determinar, mediante el método Probit, los valores de CL_{50} para la simvastatina y la carbamazepina, tanto de forma individual como asociados a los microplásticos.

Los datos de actividad colinesterasa se organizaron y presentaron en una hoja de cálculo Microsoft Excel 2013, siendo posteriormente analizados estadísticamente utilizando el programa IBM SPSS Statistics para Windows Versión 23. Este análisis consistió en comprobar la normalidad de los datos aplicando el test de Shapiro-Wilk y su homogeneidad mediante el test de Levene. A continuación, se realizó un análisis de la

varianza con un factor (ANOVA), para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Todas las hipótesis fueron aceptadas cuando el nivel de significación fue de $p \leq 0,05$. En los casos donde se apreciaron diferencias significativas, se aplicó el test de Tukey de comparaciones múltiples, estableciéndose intervalos de confianza entre cada tratamiento y el control para comprobar estas diferencias.

5. RESULTADOS.

5.1. ENSAYOS DE INGESTIÓN DE MICROPLÁSTICOS.

La ingestión de microplásticos por parte de *Artemia salina*, se determinó mediante la inspección visual al microscopio óptico. En primer lugar se observó una muestra de microplásticos, con el objetivo de identificarlos, pudiendo así distinguirlos de otras posibles partículas que pudieran estar en el aparato digestivo de los organismos. Se tomaron fotografías para tenerlas como referencia (Figura 8). Posteriormente, se procedió de la misma forma con los ejemplares de *Artemia salina* que habían permanecido las 48 horas del ensayo en el control de agua de mar, para conocer la apariencia normal de su aparato digestivo (Figuras 9, 10, 11 y 12).

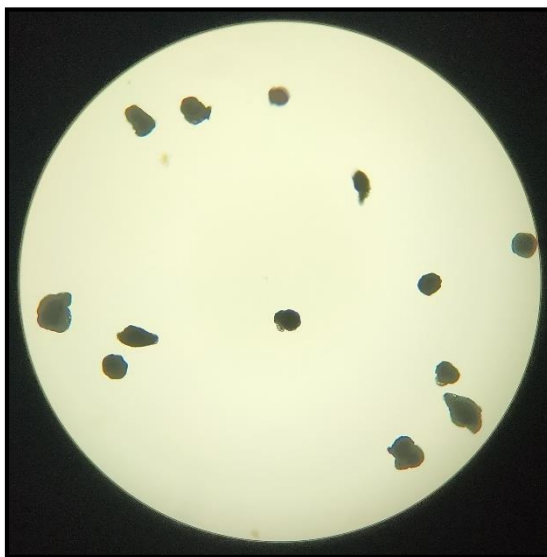


Figura 8: microplásticos primarios de PVC empleados en los ensayos. Imagen al microscopio óptico con un aumento de 100x (Fuente: elaboración propia).

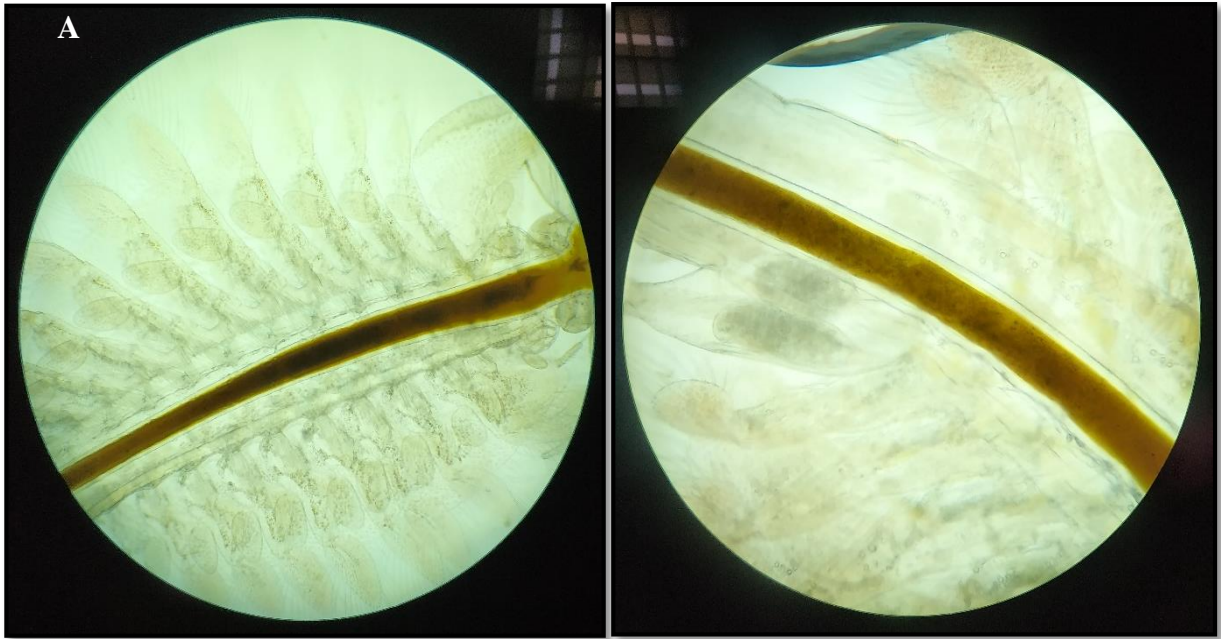


Figura 9: cuerpo de *Artemia salina* al microscopio óptico tras permanecer 48 horas en el control de agua de mar. A: 40x de aumento. B: 100x de aumento (Fuente: elaboración propia).

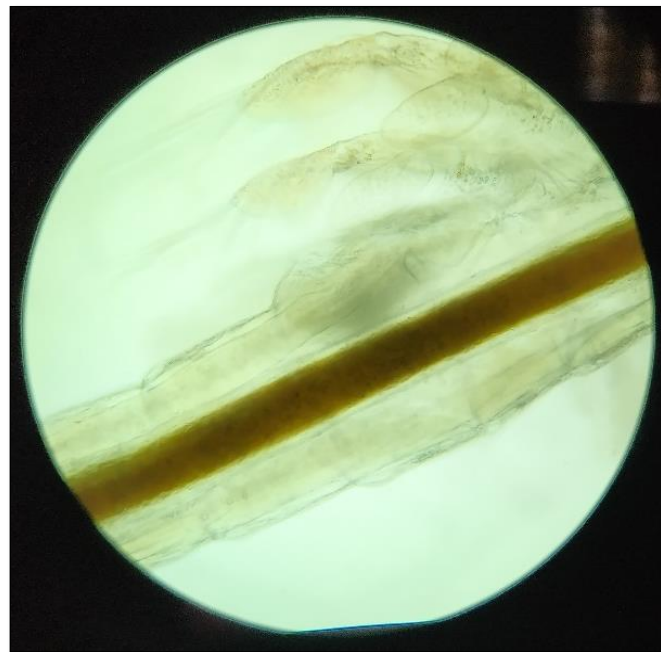


Figura 10: Abdomen de *Artemia salina*, tras permanecer durante 48 horas en el control de agua de mar, al microscopio óptico con un aumento de 100x (Fuente: elaboración propia).

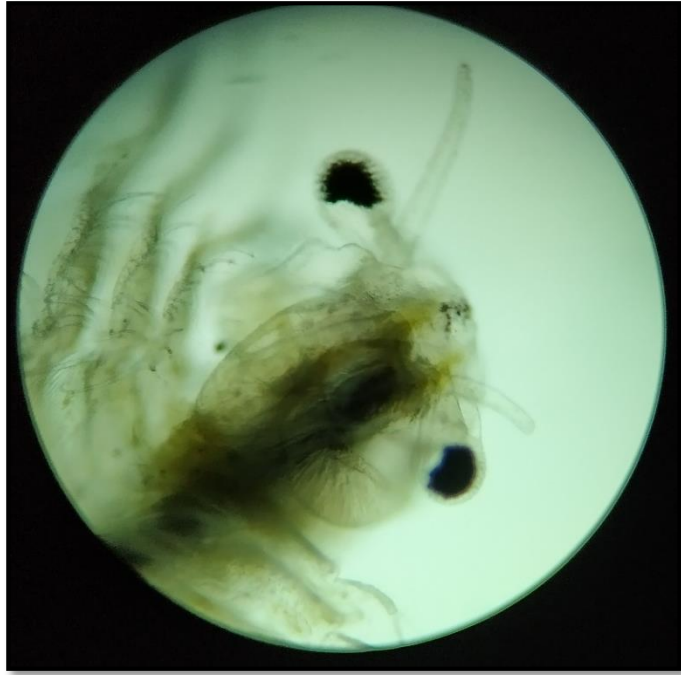


Figura 11: Cabeza de *Artemia salina*, tras permanecer durante 48 horas en el control de agua de mar, al microscopio óptico con un aumento de 40x. (Fuente: elaboración propia).

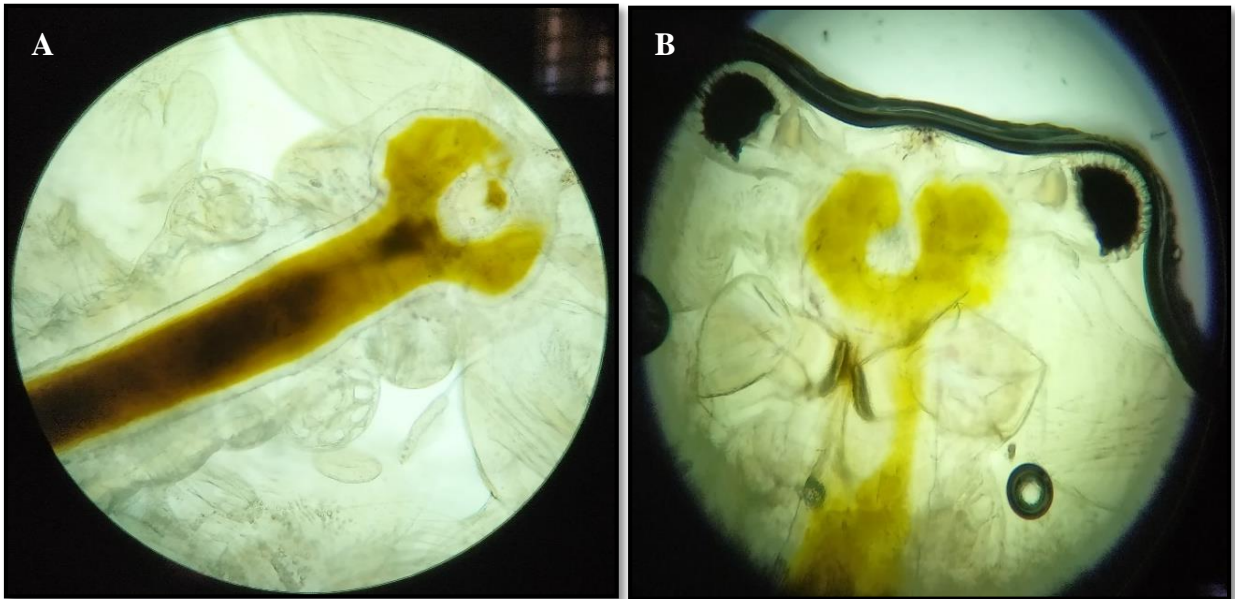


Figura 12: Imágenes al microscopio óptico de la boca de *Artemia salina* tras permanecer durante 48 horas en el control de agua de mar. A: Aumento de 40x. B: Aumento de 100x (Fuente: elaboración propia).

Se cotejaron las anteriores imágenes con las obtenidas tras examinar a los organismos expuestos a diferentes concentraciones de microplásticos. Se obtuvo como resultado que *Artemia salina* ingirió el microplástico en todas las concentraciones a las que se expuso: 0,26 mg/L (Figura 13), 0,69 mg/L (Figura 14) y 1,5 mg/L (Figura 15), pues se detectaron partículas de este a lo largo de todo su aparato digestivo.

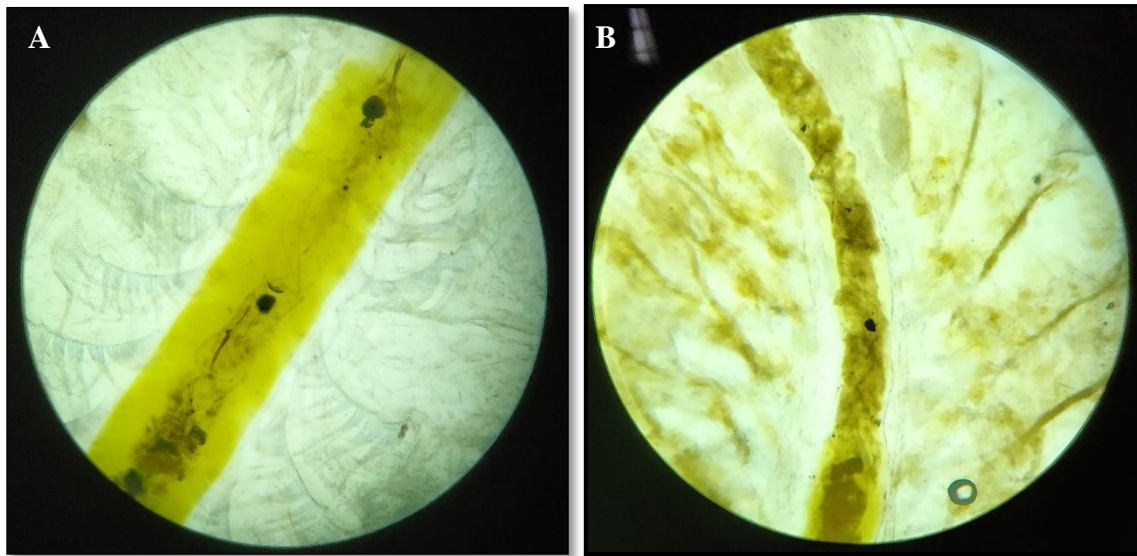


Figura 13: *Artemia salina* al microscopio óptico tras 48 horas de exposición a una concentración de 0,26 mg/L de microplásticos. A: aumento de 100x. B: aumento de 40x. (Fuente: elaboración propia).

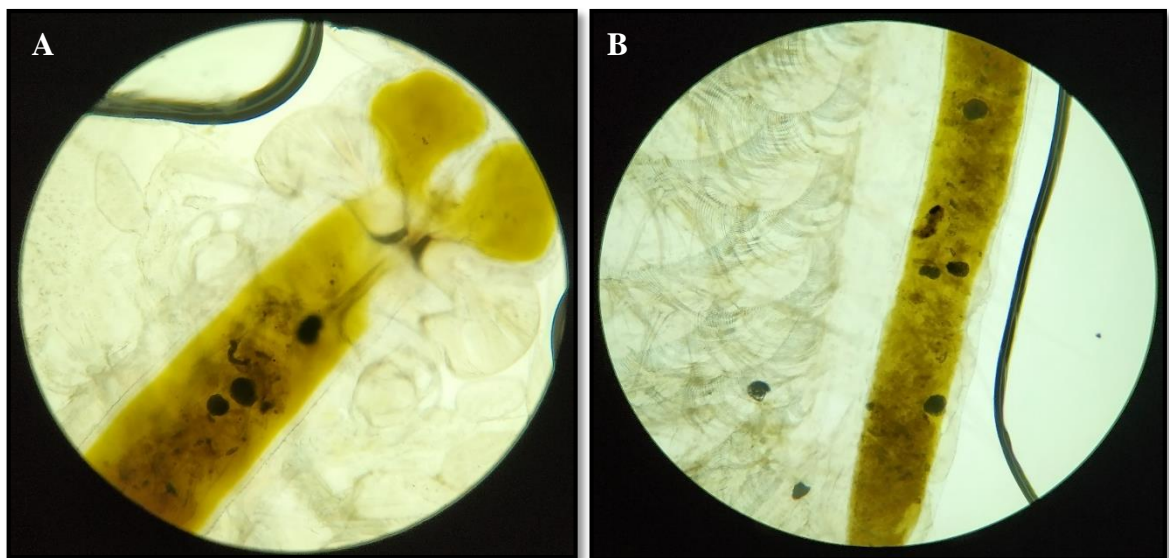


Figura 14: *Artemia salina* al microscopio óptico tras 48 horas de exposición a una concentración de 0,69 mg/L de microplásticos. A: cabeza con un aumento de 100x. B: Cuerpo con un aumento de 40x. (Fuente: elaboración propia).

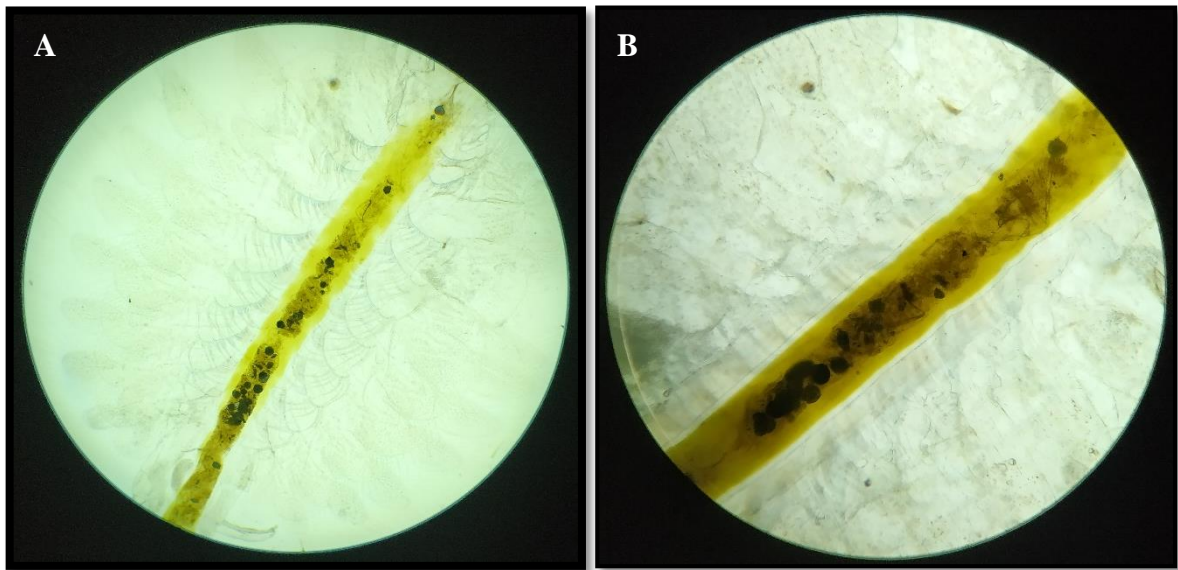


Figura 15: *Artemia salina* al microscopio óptico tras 48 horas de exposición a una concentración de 1,5 mg/L de microplásticos. A: aumento de 40x. B: aumento de 100x. (Fuente: elaboración propia).

No se contabilizó el número de microplásticos ingerido por cada organismo, pero sí se cuantificaron los organismos que presentaban microplásticos en cada una de las réplicas de cada concentración, obteniéndose el resultado que se refleja en la tabla 1. No se registró mortalidad en ninguna de las concentraciones ni el control con agua de mar durante el ensayo.

Tabla 1: cuantificación de microplásticos en el aparato digestivo de *Artemia salina*. Número de organismos en los que se detectó MP/Número de organismos en los que no se detectó MP.

Concentración MP	Réplica 1 MP/No MP	Réplica 2 MP/No MP	Réplica 3 MP/No MP	Total MP/No MP
0,26 mg/L	2/8	2/8	1/9	5/30
0,69 mg/L	4/6	5/5	2/8	11/30
1,5 mg/L	3/7	7/3	9/1	19/30

5.2. EXAMEN DE INGESTIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN LOS ENSAYOS DE ASOCIACIÓN CON FÁRMACOS (SIMVASTATINA Y CARBAMAZEPINA).

Al igual que en el ensayo previo de ingestión de microplásticos, en los ensayos realizados combinando fármacos y microplásticos (en concentración de 0,26 mg/L), se hallaron microplásticos en el aparato digestivo de los ejemplares de *Artemia salina* que sobrevivieron. En el caso del ensayo realizado con simvastatina y microplásticos (Figura 16), estos se detectaron en 58 de los 127 ejemplares expuestos a microplásticos que sobrevivieron, mientras que en el ensayo de carbamazepina y microplásticos (Figura 17), se encontraron en 71 de los 130 que sobrevivieron.

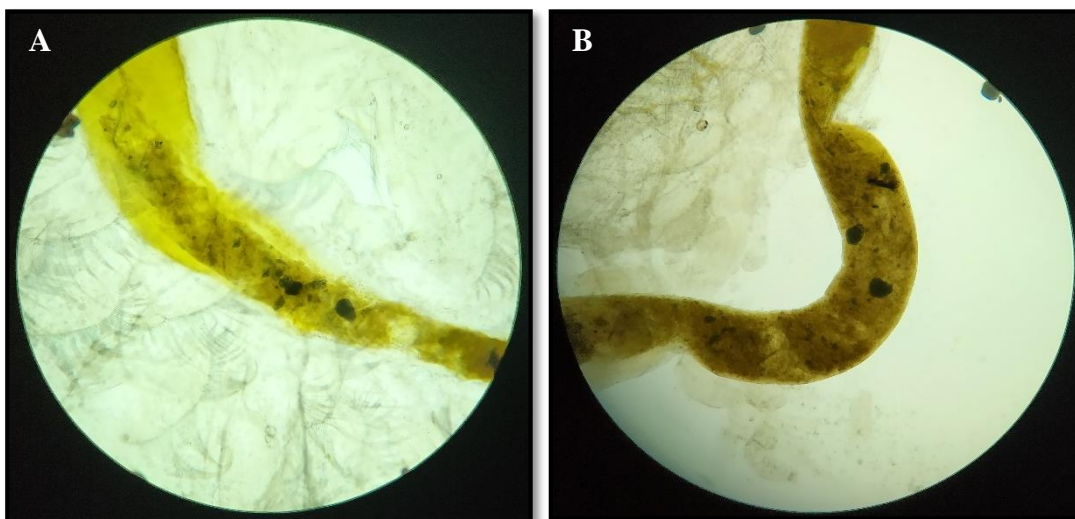


Figura 16 A y B: diferentes ejemplares de *Artemia salina* con microplásticos en el aparato digestivo procedentes del ensayo realizado con simvastatina y microplásticos.

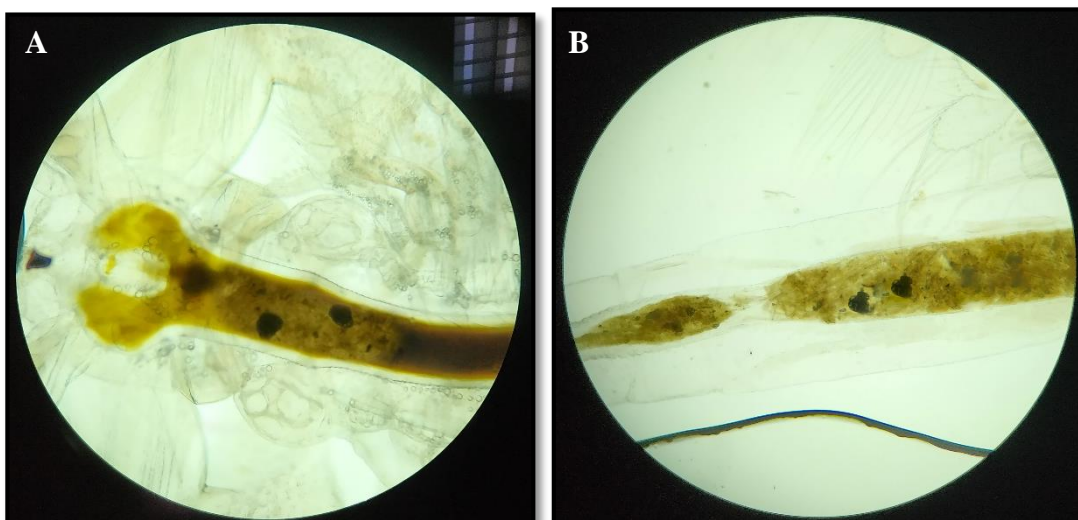


Figura 17 A y B: diferentes ejemplares de *Artemia salina* con microplásticos en el aparato digestivo procedentes del ensayo realizado con carbamazepina y microplásticos.

5.3. ENSAYO CON TÓXICO DE REFERENCIA (DICROMATO POTÁSICO).

La mortalidad causada en los organismos por el toxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$) durante las 24 horas de duración del ensayo, se expone en la siguiente tabla 2:

Tabla 2: mortalidad de *Artemia salina* expuesta a varias concentraciones del tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$) en el ensayo de 24 horas de duración.

Concentración $K_2Cr_2O_7$	Réplica 1 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 2 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 3 Inmovilizadas/Vivas	Tasa de mortalidad (%)
Control (Agua de mar)	0/10	0/10	0/10	0,00
1,25 mg/L	1/9	1/9	1/9	10,00
2,5 mg/L	2/8	1/9	2/8	16,67
5 mg/L	3/7	2/8	3/7	26,67
10 mg/L	4/6	4/6	3/7	50,00
20 mg/L	6/4	5/5	8/2	63,33
40 mg/L	9/1	7/3	8/2	80,00
80 mg/L	10/0	9/1	9/1	93,33

Para calcular la CL_{50} del $K_2Cr_2O_7$, se aplicó el método Probit a estos valores de mortalidad, resultando un valor para esta de 11,80 mg/L. Los valores obtenidos para los límites de confianza inferior y superior, ambos del 95%, fueron de 8,75 y 16,07 mg/L, respectivamente.

La base de datos de la Agencia Estatal para la protección del Medio Ambiente, establece que el valor de la CL_{50} para este tóxico, en ensayos de toxicidad aguda realizados con invertebrados, debe estar situado en el rango de 0,067-59,90 mg/L (EPA, 1980). Al encontrarse el valor obtenido para $K_2Cr_2O_7$, $CL_{50} = 11,80$ mg/L, dentro de este rango, se determinó que la calidad de la población de *Artemia salina* era óptima para la realización de los posteriores ensayos con las sustancias a investigar.

5.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD CON FÁRMACOS (SIMVASTATINA Y CARBAMAZEPINA) Y MICROPLÁSTICOS.

Los valores de los parámetros de pH, oxígeno disuelto, salinidad y temperatura medidos en uno de los acuarios utilizados para cada concentración, para controlar posibles variaciones que pudieran alterar los resultados de los ensayos, se encontraron en todos los casos dentro de los rangos considerados óptimos para garantizar el buen estado de los organismos. Los valores obtenidos se recogen en las tablas 1, 2 ,3 y 4 del ANEXO II.

Los valores para el pH en los cuatro ensayos variaron ente 7,49 y 7,63, el oxígeno disuelto se encontró entre 75,4 y 98,3 %, la conductividad entre 48,20 y 49,37 mS/cm y la temperatura entre 20,55 y 21,22°C. No se registraron variaciones significativas en los parámetros de los acuarios, durante las 48 horas de exposición, en ninguno de los 4 ensayos realizados. Disminuyeron únicamente los niveles de oxígeno, debido a que no se utilizó sistema de aireación externo, no bajando estos niveles en ninguno de los acuarios medidos del 75% de saturación. Al ser el mínimo de oxígeno disuelto establecido por la OCDE (2004) para la correcta realización de ensayos de toxicidad del 60%, se determinó que estas variaciones no afectaron a los organismos, y por tanto, tampoco a los resultados de los ensayos.

La mortalidad registrada en los ensayos donde se expuso a los organismos a distintas concentraciones crecientes de simvastatina y simvastatina asociada con microplásticos, se muestra en las siguientes tablas 3 y 4:

Tabla 3: mortalidad de *Artemia salina* expuesta a varias concentraciones de simvastatina durante las 48 horas de ensayo.

Concentración SIMVASTATINA	Réplica 1 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 2 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 3 Inmovilizadas/Vivas	Tasa de mortalidad (%)
Control (Agua de mar)	0/10	0/10	0/10	0,00
Control AC (Acetona)	0/10	1/9	0/10	3,33
5,80 mg/L	1/9	1/9	2/8	13,33
6,96 mg/L	2/8	3/7	1/9	20,00
8,35 mg/L	5/5	4/6	3/7	40,00
10,03 mg/L	4/6	6/4	6/4	53,33
12,03 mg/L	7/3	8/2	8/2	76,67

Tabla 4: mortalidad de *Artemia salina* expuesta a varias concentraciones de simvastatina y microplásticos durante las 48 horas de ensayo.

Concentración SIMVASTATINA Y MICROPLÁSTICOS	Réplica 1 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 2 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 3 Inmovilizadas/Vivas	Tasa de mortalidad (%)
Control (Agua de mar)	0/10	0/10	0/10	0,00
Control AC (Acetona)	1/9	1/9	0/10	6,66
Control MP (Agua de mar y 0,26 mg/L)	0/10	0/10	2/8	6,66
5,80 mg/L y 0,26 mg/L	1/9	2/8	0/10	10,00
6,96 mg/L y 0,26 mg/L	2/8	1/9	2/8	16,66
8,35 mg/L y 0,26 mg/L	4/6	4/6	2/8	33,33
10,03 mg/L y 0,26 mg/L	5/5	5/5	3/7	43,33
12,03 mg/L y 0,26 mg/L	6/4	9/1	5/5	66,67

En los resultados obtenidos se puede observar, que se registró una menor mortalidad en el ensayo donde se expuso a los organismos a simvastatina y microplásticos de forma conjunta. En las concentraciones más bajas, 5,80 y 6,96 mg/L, la diferencia de mortalidad fue ligeramente menor en este ensayo, haciéndose mucho más notable a partir de la concentración de 8,35 mg/L. En las concentraciones más altas, 10,03 y 12,03 mg/L, la diferencia de mortalidad registrada entre ambos ensayos fue la más elevada, siendo esta de un 10% en ambas concentraciones.

En los controles visuales que se llevaron a cabo durante ambos ensayos, no se observó ningún tipo de alteración, ni en la fisionomía ni el comportamiento de los organismos.

La mortalidad registrada los ensayos donde se expuso a los organismos a distintas concentraciones crecientes de carbamazepina y simvastatina asociada con microplásticos, se muestra en las siguientes tablas 5 y 6:

Tabla 5: mortalidad de *Artemia salina* expuesta a varias concentraciones de carbamazepina durante las 48 horas de ensayo.

Concentración CARBAMAZEPINA	Réplica 1 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 2 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 3 Inmovilizadas/Vivas	Tasa de mortalidad (%)
Control (Agua de mar)	0/10	0/10	0/10	0,00
Control AC (Control Acetona)	0/10	0/10	0/10	0,00
25,16 mg/L	1/9	2/8	0/10	10,00
30,14 mg/L	2/8	1/9	2/8	16,66
36,17 mg/L	3/7	3/7	4/6	33,33
43,40 mg/L	4/6	4/6	5/5	43,33
52,08 mg/L	7/3	7/3	8/2	73,33

Tabla 6: mortalidad de *Artemia salina* expuesta a varias concentraciones de carbamazepina durante las 48 horas de ensayo.

Concentración CARBAMAZEPINA Y MICROPLÁSTICOS	Réplica 1 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 2 Inmovilizadas/Vivas	Réplica 3 Inmovilizadas/Vivas	Tasa de mortalidad (%)
Control (Agua de mar)	0/10	0/10	0/10	0,00
Control AC (Control Acetona)	0/10	1/9	0/10	3,33
Control MP (Agua de mar y 0,26 mg/L)	1/9	0/10	2/8	10,00
25,16 mg/L y 0,26 mg/L	1/9	1/9	1/9	10,00
30,14 mg/L y 0,26 mg/L	2/8	1/9	2/8	16,67
36,17 mg/L y 0,26 mg/L	3/7	3/7	2/8	26,67
43,40 mg/L y 0,26 mg/L	4/6	5/5	3/7	40,00
52,08 mg/L y 0,26 mg/L	7/3	6/4	6/4	63,33

En los resultados se aprecia que se produjo la misma tasa de mortalidad en *Artemia salina*, ante su exposición a las concentraciones de 25,16 y 30,14 mg/L, siendo esta del 10 y 16,66 % respectivamente, tanto en el ensayo con únicamente carbamazepina como en el de carbamazepina asociada a microplásticos. A partir de la concentración de 36,17 mg/L se empezó a diferenciar la mortalidad de ambos ensayos, siendo esta más alta en el que sólo se expuso a los organismos a carbamazepina. La mayor diferencia de mortalidad

entre los ensayos se produjo en la concentración de 52,08 mg/L de carbamazepina, siendo esta del 10%.

En los controles visuales realizados durante los ensayos, no se observaron alteraciones en la fisionomía de los organismos pero sí se registraron alteraciones en su comportamiento. Los ejemplares de *Artemia salina* que sobrevivieron en las concentraciones de 30,14 y 36,17 mg/L de ambos ensayos, presentaban una movilidad inconstante, en la que alternaban periodos de total inmovilidad con periodos de movimientos natatorios acelerados. En las concentraciones más altas, de 43,40 y 52,08 mg/L de ambos ensayos, no presentaban movilidad alguna y solo reaccionaban cuando eran estimulados mecánicamente con una varilla de vidrio.

En los controles de agua de mar no se registró la muerte de ningún organismo, en los de acetona la mortalidad fue del 3,33% (en 2 ensayos) y del 6,66% (en 1 ensayo), y en los de microplásticos del 6,66 y el 10%. Según la guía de la OCDE, la mortalidad de los controles no puede ser superior al 10%, para que el ensayo sea considerado válido, dado que en ninguno de los cuatro ensayos realizados en este trabajo se superó este porcentaje, se consideran válidos.

Utilizando los datos de mortalidad obtenidos y el programa estadístico de la EPA-USA se calcularon, mediante el método Probit, los valores para la 48-CL₅₀ con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, para ejemplares adultos de *Artemia salina* expuesta a las diferentes sustancias utilizadas. Los resultados se muestran en la tabla 7.

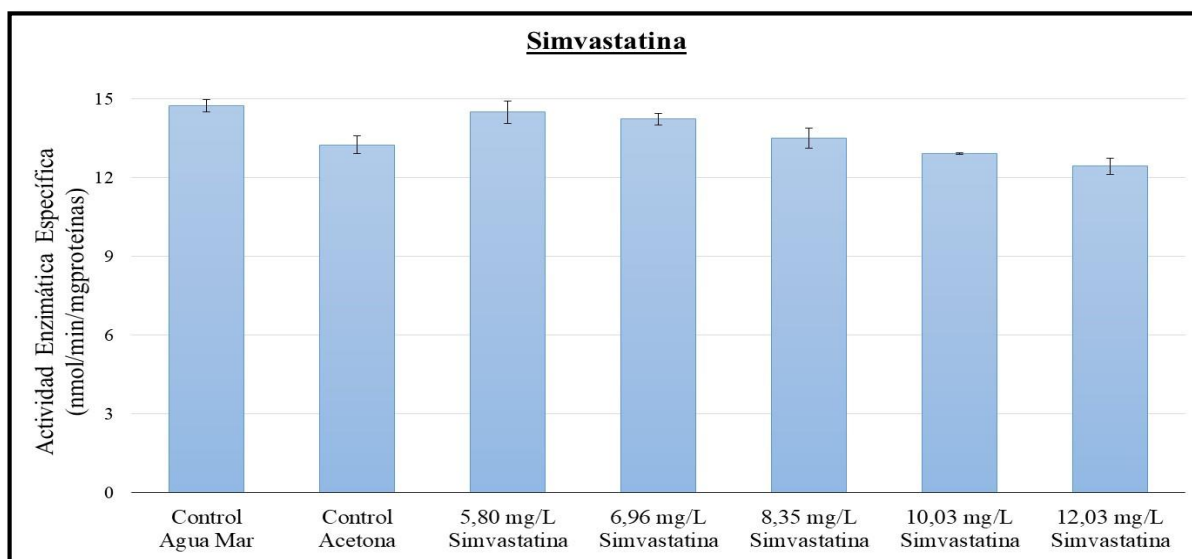
Tabla 7: valores para la 48h-CL₅₀ con sus respectivos intervalos de confianza para adultos de *Artemia salina* expuesta a diferentes sustancias.

Sustancia	48h-CL₅₀ (mg/L)	Intervalos de confianza del 95% (mg/L)
Simvastatina	9,35	(8,58 - 10,43)
Simvastatina y microplásticos	10,29	(9,34 - 12,02)
Carbamazepina	43,25	(39,59 - 49,04)
Carbamazepina y microplásticos	46,50	(41,95 - 55,72)

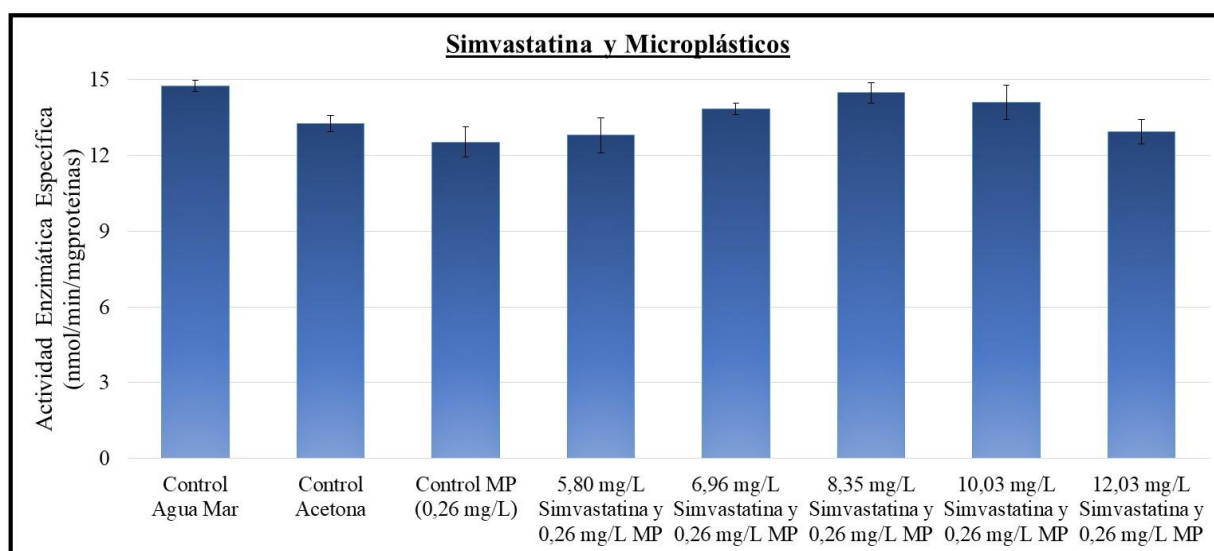
5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA PRESENTE EN *ARTEMIA SALINA*.

Después de calcular las proteínas y la actividad enzimática presentes en las muestras obtenidas en los ensayos, se determinó la actividad específica colinesterasa presente en *Artemia salina* tras 48 horas de exposición a los distintos tóxicos.

Los resultados obtenidos en el ensayo con simvastatina y en el de simvastatina asociada a microplásticos, se muestran en las siguiente gráficas 1 y 2:



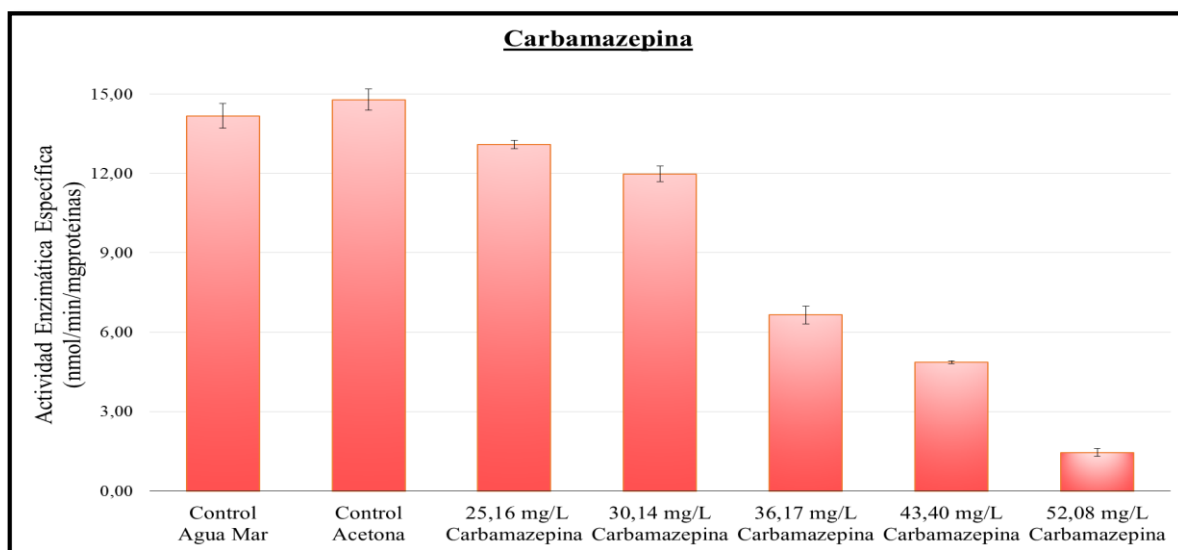
Gráfica 1: Actividad colinesterasa obtenida presente en *Artemia salina* tras su exposición de 48 horas a distintas concentraciones de simvastatina. Las barras representan la media de las réplicas de cada concentración, con sus correspondientes barras de error estándar de la media.



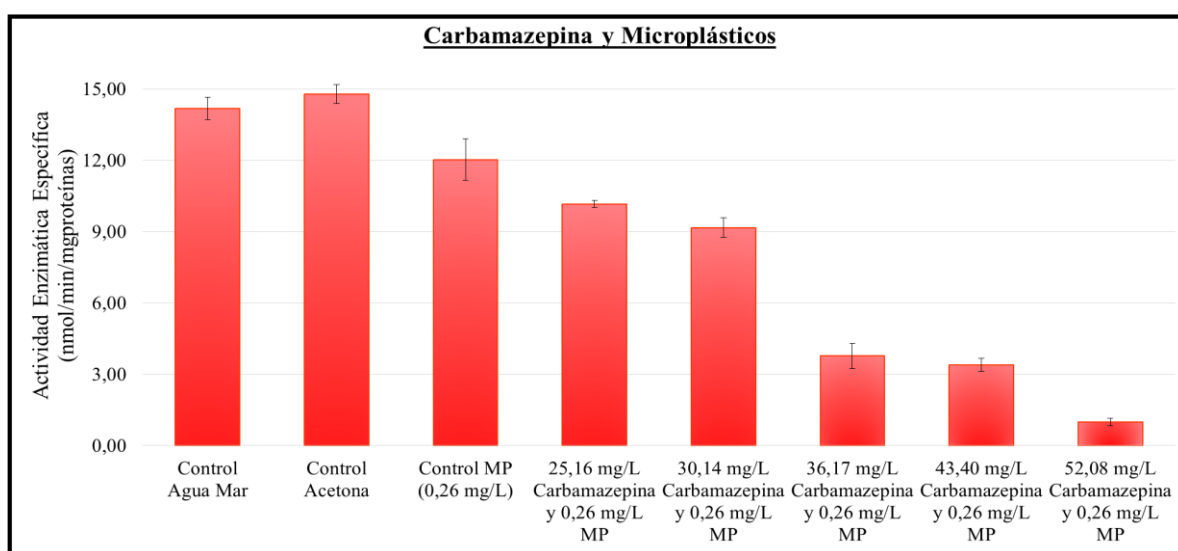
Gráfica 2: Actividad colinesterasa obtenida presente en *Artemia salina* tras su exposición de 48 horas a distintas concentraciones de simvastatina y microplásticos. Las barras representan la media de las réplicas de cada concentración, con sus correspondientes barras de error estándar de la media.

Una vez comprobadas la normalidad y la homogeneidad de los datos de actividad colinesterasa de ambos ensayos, se aplicó a los mismos un test ANOVA de un solo factor, obteniéndose como resultado que no se aprecian diferencias estadísticamente significativas, entre los organismos expuestos a los controles y los expuestos a las diferentes concentraciones de tóxicos.

Los resultados obtenidos en el ensayo con carbamazepina y en el de carbamazepina asociada a microplásticos, se muestran en las siguientes gráficas 3 y 4:



Gráfica 3: Actividad colinesterasa obtenida presente en *Artemia salina* tras su exposición de 48 horas a distintas concentraciones de carbamazepina. Las barras representan la media de las réplicas de cada concentración, con sus correspondientes barras de error estándar de la media.



Gráfica 4: Actividad colinesterasa obtenida presente en *Artemia salina* tras su exposición de 48 horas a distintas concentraciones de carbamazepina y microplásticos. Las barras representan la media de las réplicas de cada concentración, con sus correspondientes barras de error estándar de la media.

Se aplicó a los datos el test ANOVA de un solo factor, obteniéndose como resultado, la existencia de diferencias estadísticamente significativas, entre los grupos control y los grupos expuestos a las distintas concentraciones de carbamazepina, tanto sola como asociada a microplásticos. Para analizar estas diferencias se empleó el test de Tukey de comparaciones múltiples.

En el ensayo con sólo carbamazepina, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los controles de agua mar y de acetona con las concentraciones de 36,17, 43,30 y 52,08 mg/L, entre la concentración de 25,16 mg/L y las concentraciones de 36,17, 43,30 y 52,08 mg/L, entre la concentración de 30,14 mg/L y las concentraciones de 36,17, 43,30 y 52,08 mg/L, entre la concentración de 36,17 mg/L y la de 52,08 mg/L, y entre la concentración de 43,30 mg/L y la de 52,08 mg/L.

En el ensayo con carbamazepina y microplásticos se observó una mayor inhibición de la actividad colinesterasa, presente en *Artemia salina* que en el realizado únicamente con carbamazepina. Tras el análisis estadístico de los datos, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los controles de agua de mar, acetona, y todas las concentraciones de carbamazepina asociada a microplásticos que se utilizaron en el ensayo. El control de microplásticos presentó diferencias significativas con las concentraciones de 25,16, 30,14, 36,17, 43,40 y 52,08 mg/L. También se determinó la existencia de estas diferencias entre la concentración de 36,17 mg/L y las de 25,16 y 30,14 mg/L, entre la concentración de 43,30 mg/L y las de 25,16 y 30,14 mg/L, y entre 52,08 mg/L y 25,16 mg/L y 30,14 mg/L, llevando todas estas concentraciones incluidos los 0,26 mg/L de microplásticos.

Además, se compararon los resultados obtenidos entre iguales concentraciones de ambos ensayos, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas.

6. DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que tanto la simvastatina como la carbamazepina causan efectos tóxicos en los organismos adultos de *Artemia salina*, siendo estos mayores en el caso de la carbamazepina. La asociación de los microplásticos con los fármacos, provocó un leve descenso en la toxicidad de estos.

Entre los valores obtenidos de CL_{50} para los diferentes compuestos investigados, la simvastatina ha resultado ser el más tóxico ($CL_{50}= 9,35$ mg/L), seguido de la combinación de simvastatina y microplásticos ($CL_{50}= 10,29$ mg/L), la carbamazepina ($CL_{50}= 43,23$ mg/L) y, por último, la asociación de simvastatina y microplásticos, ($CL_{50}= 46,50$ mg/L). En base a estos resultados, se puede observar que la presencia de microplásticos en el medio acuoso, disminuyó levemente la mortalidad registrada en los ensayos, con el consecuente aumento de la CL_{50} de estos.

El valor obtenido de 48h- CL_{50} de simvastatina para *Artemia salina*, ha sido de 9,35 mg/L. Tras la revisión bibliográfica, ha quedado de manifiesto la escasez de estudios que aborden los efectos de la simvastatina en los organismos acuáticos. En el caso de la especie *Artemia*, la CL_{50} no ha sido determinada por otros autores. No obstante, esta si ha sido determinada en otros crustáceos acuáticos. Estudios realizados por Dahl *et al.* (2006), establecieron la 96h- CL_{50} para el copépodo *Novanapis spinipes* en 810 μ g/L. Key *et al.* (2007), determinaron un valor de la 96h- CL_{50} de 1,18 mg/L para larvas de *Palaemonetes pugio*, y superior a los 10 mg/L para los ejemplares adultos de la misma especie, siendo este valor muy similar al obtenido en este trabajo para el crustáceo *Artemia salina*.

En peces, Ribeiro *et al.* (2015), han estudiado los efectos que provoca la simvastatina el pez cebra (*Dario rerio*), estableciendo la CL_{50} de 5 mg/L para los embriones de este organismo. Otro estudio realizado por Key *et al.* (2009), determina una CL_{50} de 2,68 mg/L para el pez de estuario *Fundulus heteroclitus*.

Debido al limitado número de estudios previos publicados, es difícil encontrar autores que hayan estudiado los efectos tóxicos que la simvastatina provoca en los organismos, ahora bien, la dificultad aumenta exponencialmente para encontrar estudios previos que determinen como puede alterarse su toxicidad si se asocia a microplásticos.

En este trabajo se estableció para la combinación de simvastatina y microplásticos, un valor para la CL_{50} de 10,30 mg/L, siendo este 0,95 mg/L menor, que el establecido para la simvastatina ($CL_{50}=9,35$ mg/L). Estos datos muestran como la presencia de microplásticos en el medio acuoso, produjo una leve reducción de la toxicidad producida por la simvastatina en *Artemia salina*.

En cuanto a sus efectos sobre la actividad enzimática colinesterasa, con los resultados obtenidos, se puede afirmar que la simvastatina no causa efectos relevantes sobre dicha actividad, debido a que no se registraron diferencias estadísticamente

significativas entre las medidas de actividad colinesterasa obtenidas en los grupos control y los grupos expuestos a las distintas concentraciones de este fármaco. Se registró el mismo resultado tanto para el ensayo donde se investigaban los efectos de la simvastatina, como en el ensayo de simvastatina asociada a microplásticos.

Los pocos estudios previos, realizados por otros autores, obtuvieron el mismo resultado. El estudio, anteriormente mencionado, realizado por Key *et al.* (2009), con el pez *Fundulus heteroclitus*, determinó que su exposición durante 96 horas a simvastatina redujo ligeramente, de forma no significativa, la actividad colinesterasa. En crustáceos, el ensayo llevado a cabo por Key *et al.* (2007), tuvo como resultado que concentraciones de simvastatina situadas en el rango de 0,001 a 10 mg/L, no causaban alteraciones en la actividad acetilcolinesterasa presente, tanto en larvas como en adultos, en el camarón *Palaemonetes pugio*.

Teniendo en cuenta que la simvastatina es un fármaco de uso común muy recetado, y que su descarga en el medio acuático se ha incrementado en los últimos años, es factible pensar que su presencia en el medio ambiente tienda a aumentar, pudiendo, en consecuencia, aumentar el riesgo de que produzca efectos no deseados en las especies más sensibles. Por todo esto, y a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, sería conveniente continuar investigando los efectos subletales que puede causar este fármaco, realizando ensayos con otros taxones, con organismos en diferentes etapas de desarrollo, utilizando distintos biomarcadores para valorar los posibles efectos producidos y aumentando el tiempo de exposición al fármaco mediante ensayos de toxicidad crónica. Debido a la falta de datos, también sería de interés continuar realizando investigaciones que aclaren como interacciona la simvastatina con los microplásticos.

En el caso de la carbamazepina, el valor obtenido de 48h-CL₅₀ para *Artemia salina* ha sido de 43,23 mg/L. No existe actualmente bibliografía de otros autores que hayan determinado la CL₅₀ de la carbamazepina en *Artemia salina*. En crustáceos, Kim *et al.* (2007), estimaron un valor para la 96h-CL₅₀ en *Daphnia magna* de 76,3 mg/L. Una concentración muy parecida obtuvieron Ferrari *et al.* (2004), quienes determinaron la 48h-CL₅₀ de 77,7 mg/L en este mismo organismo. Estas concentraciones difieren con la obtenida en este trabajo, al ser significativamente más elevadas, por lo que se podría afirmar que *Artemia salina* es un organismo más sensible a la carbamazepina que *Daphnia magna*. No obstante, sería adecuado realizar más estudios similares, para

comprobar que esta diferencia entre los valores de CL_{50} , se deben efectivamente a la sensibilidad de las especies y no a la posible variabilidad de los organismos de las diferentes poblaciones expuestas.

Para la asociación de carbamazepina y microplásticos, se obtuvo una CL_{50} de 46,50 mg/L, siendo esta más elevada (en 3,30 mg/L) que la obtenida para únicamente la carbamazepina. Se obtuvo, por tanto, un patrón similar a lo ocurrido anteriormente con la simvastatina.

Con la metodología empleada en este trabajo, se ha obtenido como resultado que la combinación de ambos fármacos con los microplásticos, disminuyen su toxicidad. Sin embargo, el ensayo realizado por Brandts *et al.* (2018), determinó que la exposición a carbamazepina asociada a nanoplasticos (poliestireno), indujo una regulación negativa significativa en la expresión genética en los mejillones *Mytilus galloprovincialis* en comparación con la exposición a únicamente carbamazepina. Además, estudios realizados por Gambardella *et al.* (2017), tuvieron como resultado que la exposición de organismos a solamente microplásticos (poliestireno), causa efectos neurotóxicos en nauplios de *Artemia franciscana* y *Amphibalanus Anfitrite*. Debido a estos resultados y a los limitados datos disponibles, es necesario continuar realizando ensayos en los que se empleen diferentes metodologías, como dopar previamente los microplásticos con los fármacos para reducir el proceso de adsorción que se produce en los acuarios, y poder esclarecerse las interacciones reales que se producen entre los fármacos y microplásticos.

En cuanto a los efectos causados por la carbamazepina en la actividad colinesterasa presente en *Artemia salina*, se determinó que la exposición a este fármaco inhibe significativamente dicha actividad, en una relación dependiente de la concentración. Iguales resultados arrojaron investigaciones realizadas por otros autores con diferentes especies de organismos invertebrados. Así, Siebel *et al.* (2010), demostraron en ensayos *in vitro*, que la carbamazepina inhibe la actividad acetilcolinesterasa presente en el cerebro del pez cebra (*Dario rerio*). En crustáceos, Nkoom *et al.* (2019), registraron una disminución significativa de la actividad acetilcolinesterasa presente en ejemplares de *Daphnia magna* expuesta a las concentraciones de 5 y 100 $\mu\text{g/L}$, así como una capacidad para bioconcentrarse en el medio acuoso, en condiciones de laboratorio, manteniéndose casi intacta la concentración inicial durante las 48 horas de duración del ensayo.

En el ensayo de asociación de carbamazepina y microplásticos se obtuvo el mismo resultado, registrándose una importante inhibición de la actividad colinesterasa en *Artemia salina*. La actividad colinesterasa registrada en este ensayo, fue ligeramente menor a la obtenida en el ensayo de carbamazepina aislada, sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre iguales concentraciones de ambos ensayos, por lo que no se puede determinar si la presencia de los microplásticos en el medio fue la causante de las diferencias observadas.

7. CONCLUSIONES.

A partir de los datos obtenidos en este trabajo, se enumeran las siguientes conclusiones:

- Los fármacos y los microplásticos son contaminantes que interaccionan entre sí, formando mezclas complejas, que en el presente estudio, presentan una toxicidad levemente distinta a la de los propios contaminantes aislados.
- Se comprobó que *Artemia salina* ingirió microplásticos en todas las concentraciones a las que fue expuesta. La ingestión de microplásticos por parte de los organismos, aumentó con el incremento de la concentración de este en el medio.
- Los ensayos de toxicidad realizados registraron mortalidad en todos los casos, determinándose la CL_{50} de los tóxicos empleados. La CL_{50} de la simvastatina resultó ser de 9,35 mg/L y de 43,23 mg/L para la carbamazepina. En las condiciones de los ensayos, la presencia de microplásticos en el medio disminuyó la toxicidad de ambos fármacos.
- No se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática colinesterasa, entre los organismos control y los expuestos a las distintas concentraciones de simvastatina, tanto sola como asociada a microplásticos. Si se registraron diferencias significativas entre los grupos control y los grupos expuestos, en el ensayo realizado de carbamazepina y en el de carbamazepina y microplásticos.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- AEMPS. (2014). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Utilización de medicamentos hipolipemiantes en España durante el periodo 2000-2012. Informe de utilización de medicamentos U/HLP/V1/17012014. Consultado el 30 de septiembre de 2019, en <https://www.aemps.gob.es/?s=HIPOLIPEMIANTE>
- AEMPS. (2017). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Utilización de medicamentos antiepilépticos en España durante el periodo 2008-2016. Informe de utilización de medicamentos U/EPIL/V1/11/09/2017 Consultado el 30 de septiembre, en <https://www.aemps.gob.es/?s=antiepilepticos>
- AEMPS. (2019). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Consultado el 30 de septiembre de 2019, en <https://www.aemps.gob.es/>
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596–1605.
- Barbosa, T., Luiz, A., Paiva, R., Maria, M., Bezerra, M., Carla, D., y Cabral, P. (2019). *Chemosphere Analysis of the presence of anti-inflammatory drugs in surface water : A case study in Beberibe river - PE , Brazil . 222, 961–969.*
- Barboza, L., Vieira, L., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., y Guilhermino, L. (2018). Microplastics cause neurotoxicity , oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass , *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus , 1758). *Aquatic Toxicology*, 195, 49–57.
- Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10).
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 254, 248–254.
- Biel-Maeso, M., Baena-Nogueras, R. M., Corada-Fernández, C., y Lara-Martín, P. A. (2018). Science of the Total Environment Occurrence , distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Science of the Total Environment*, 612, 649–659.

- Brandts, I., Teles, M., Gonçalves, A. P., Barreto, A., Franco-Martinez, L. y Tvarijonaviciute, A. (2018). Science of the Total Environment Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Science of the Total Environment*, 643, 775–784.
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., Liang, X., y Martyniuk, C. J. (2019). Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, 208, 138–145.
- Chen, X., Cho, S. J. I. N., Li, Y. I., y Venkatesh, S. (2002). Prediction of Aqueous Solubility of Organic Compounds Using a Quantitative Structure – Property Relationship. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(8), 1838–1852.
- Clegg, J. S., Hoa, N., y Sorgeloos, P. (2001). Thermal tolerance and heat shock proteins in encysted embryos of *Artemia* from widely different thermal habitats. *Hydrobiologia*, 466, 221–229.
- Dahl, U., Gorokhova, E., y Breitholtz, M. (2006). Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using a harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology*, 77, 433–438.
- Deudero, S., y Alomar, C. (2015). Mediterranean marine biodiversity under threat: Reviewing influence of marine litter on species. *Marine Pollution Bulletin*.
- Ellesat, K. S., Tollefsen, K., Åsberg, A., Thomas, K. V., y Hylland, K. (2010). Toxicology in Vitro Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 24(6), 1610–1618.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Eto, M. (1974). Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry (Ohio: CRC Press, Inc.).
- EVCN (Consejo Europeo de Fabricantes de Vinilo) (2019). Consultado el 9 de octubre de 2019 en <https://pvc.org/>
- Faggiotto, A., y Paoletti, R. (1999). Starins and Blockers of the Renin-Angiotensin

- System. Vascular Protection Beyond Rheir Primary Mode of Action. *Hypertension*, 2, 987–996.
- FAO. (1986). Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Consultado el 9 de noviembre, en <http://www.fao.org/3/AB474S/AB474S00.htm>
- FAO. (2019). Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets. Consultado el 5 de noviembre de 2019, en http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Artemia_spp/en
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., y Garric, J. (2004). Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1344–1354.
- Fulton, M. H., y Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 20(1), 37–45.
- Franzellitti, S., Balbi, T., Montagna, M., Fabbri, R., Valbonesi, P., Fabbri, E., y Canesi, L. (2019). Chemosphere Phenotypical and molecular changes induced by carbamazepine and propranolol on larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 234, 962–970.
- Gagnaire, B., Geffard, O., Xuereb, B., Margoum, C., y Garric, J. (2008). Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails , *Potamopyrgus antipodarum* (*Mollusca* , *Hydrobiidae* , Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (*Mollusca* , *Valvatidae* , Mu). *Chemosphere*, 71, 553–560.
- Gambardella, C., Morgana, S., Ferrando, S., Bramini, M., Piazza, V., Costa, E., Garaventa, F., y Faimali, M. (2017). Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145(May), 250–257.
- Gelabert R. (2001). *Artemia* bioencapsulation: I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *Journal of Crustacean Biology*, 21,435–442
- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P. y Soares, A. M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia*

magna. *Chemosphere*, 32, 727-738.

- Guilhermino, L., Lacerda, M. N., Nogueira, A. J. A. y Soares, A. M. V. M. (2000). *In vitro and in vivo inhibition of Daphnia magna acetylcholinesterase by surfactant agents : possible implications for contamination biomonitoring*. 137–141.
- Hernando M., Heath E., Petrovic M. y Barcelo D. (2006). Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 985-991.
- Jeyaratnam, J., y Maroni, M. (1994). Organophosphorus compounds. *Toxicology*, 91, 15–27.
- Kappas, I., Abatzopoulos, T. J., Hoa, N., Sorgeloos, P. y Beardmore, J. A. (2004). Genetic and reproductive differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment. *Marine Biology*, 146(1), 103–117.
- Key, P. B., Hoguet, J., Chung, K. W., Venturella, J. J., Pennington, P. L. y Fulton, M. H. (2009). Lethal and sublethal effects of simvastatin , irgarol , and PBDE-47 on the estuarine fish , *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Environmental Science an Health*, 1234, 379–382.
- Key, P. B. y Fulton, M. H. (2002). Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(3), 186-192.
- Key, P. B., Hoguet, J., Reed, L. A., Chung, K. W. y Fulton, M. H. (2007). Effects of the Statin Antihyperlipidemic Agent Simvastatin on Grass Shrimp , *Palaemonetes pugio*. *Wiley InterScience*, 153–160.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G. y Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33(3), 370–375.
- Kristoff, G., Guerrero, N. V., D'Angelo, A. M. y Cochón, A. C. (2006). Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates : *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicology*, 222, 185–194.
- Kumar, A., Doan, H., Barnes, M., Chapman, J. C. y Kookana, R. S. (2010). Ecotoxicology

- and Environmental Safety Response and recovery of acetylcholinesterase activity in freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda : *Atyidae*) exposed to selected anti-cholinesterase insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1503–1510.
- Kümmerer, K. (2011). Emerging Contaminants. *Treatise on Water Science*, 3, 69–87.
- Lestari, P. y Trihadiningrum, Y. (2019). The impact of improper solid waste management to plastic pollution in Indonesian coast and marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110505.
- Li, J., Zhang, K. y Zhang, H. (2018). Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environmental Pollution*, 237, 460–467.
- Liu, Z., Arogo, J., Pruden, A. y Knowlton, K. F. (2011). Science of the Total Environment Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. *Science of the Total Environment*, 409(24), 5149–5161.
- Luís, L. G., Ferreira, P., Fonte, E., Oliveira, M. y Guilhermino, L. (2015). Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium(VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. *Aquatic Toxicology*, 164, 163–174.
- Magni, S., Binelli, A., Pittura, L., Giacomo, C., Della, C., Carla, C. y Regoli, F. (2019). The fate of microplastics in an Italian Wastewater Treatment Plant. *Science of the Total Environment*, 652, 602–610.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C. y Kaminuma, T. (2001). Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. *Environmental Science & Technology*, 35(2), 318–324.
- Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G. y Di Delupis, D. G. (1997). Toxicity of several important agricultural to *Artemia*. *Water Research*, 31(7), 1801–1806.
- Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J. y Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1–2), 178–185.
- Neuparth, T., Martins, C., Santos, C. B. D. L., Costa, M. H., Martins, I., Costa, P. M. y Santos, M. M. (2014). Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts

- reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. *Aquatic Toxicology*, 155, 337–347.
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Yang, H. y Dong, H. (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 11–18.
- Nunes, B., Carvalho, F. y Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62, 581–594.
- OECD. (2014). *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation. *Guideline for testing of chemicals*, 202.
- Pan, Z., Liu, Q., Sun, Y., Sun, X. y Lin, H. (2019). Environmental implications of microplastic pollution in the Northwestern Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 215–224.
- Plastics Europe. (2019). An analysis of European plastics production, demand and waste data. *Plastics-the Facts 2019*.
- Primrose, N., Naicker, D., Ncube, S. y Chimuka, L. (2019). Determination of naproxen , diclofenac and ibuprofen in Umgeni estuary and seawater: A case of northern Durban in KwaZulu – Natal Province of South Africa. *Regional Studies in Marine Science*, 29, 100675.
- PubChem, Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2007): Consultado el 9 de octubre de 2019, en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/3019>
- Rainieri, S., Conlledo, N., Larsen, B. K., Granby, K. y Barranco, A. (2018). *Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebra fish (Danio rerio)*, 162, 135–143.
- Ribeiro, S., Torres, T., Martins, R. y Santos, M. M. (2015). Ecotoxicology and Environmental Safety Toxicity screening of Diclofenac, Propranolol, Sertraline and Simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 67–74.

- RxList. (2018). Consultado el 1 de octubre de 2019, en <https://www.rxlist.com/tegretol-drug.htm#clinpharm>
- RxList. (2019). Consultado el 16 de octubre de 2019, en <https://www.rxlist.com/zocor-drug.htm#description>
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L. y Treilhou, M. (2008). Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere*, 71, 1832–1839.
- Siebel, A. M., Rico, E. P., Capiotti, K. M., Piato, A. L., Cusinato, C. T., Franco, T. M. A., Bogo, M. R. y Bonan, C. D. (2010). Toxicology In vitro effects of antiepileptic drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1279–1284.
- Sighicelli, M., Pietrelli, L., Lecce, F., Iannilli, V., Falconieri, M., Coscia, Di Vito, S., Nuglio, S. y Zampetti, G. (2018). Microplastic pollution in the surface waters of Italian Subalpine. *Environmental Pollution*, 236, 645–651.
- Silva, C. O., Novais, S. C., Alves, L. M. F., Soares, A. M. V. M., Barata, C. y Lemos, M. F. L. (2019). Linking cholinesterase inhibition with behavioural changes in the sea snail *Gibbula umbilicalis*: Effects of the organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 108570.
- Sturm, A., Silva de Assis, H. C. y Hansen, P. D. (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47, 389–398.
- Talesa, V., Contenti, S., Principato, G. B., Pascolini, R., Giovannini, E. y Rosi, G. (1992). Cholinesterases from *Maia Verrucosa* and *Palinuru vulgaris*: a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 101(3), 499–503.
- Thi, H., Silvestre, F., Scippo, M., Thome, J., Thanh, N. y Kestemont, P. (2009). Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1442), 1463–1470.
- TOXNET. (2017a). Toxicology Data Network. Consultado el 5 de noviembre de 2019, en

<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7208>

TOXNET. (2017b). Toxicology Data Network. Consultado el 5 de noviembre de 2019, en <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3019>

Thompson, H. y Walker, C. (1992). Blood esterases as indicators of exposure to organophosphorus and carbamate insecticides. *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, M.C. Fossi and C. Leonzio, eds., 37–62.

Tubic-Grozdanic, M., Hilfinger, J. M., Amidon, G. L., Kim, J. S., Kijek, P., Staubach, P. y Langguth, P. (2008). Pharmacokinetics of the CYP 3A substrate simvastatin following administration of delayed versus immediate release oral dosage forms. *Pharmaceutical Research*, 25(7), 1591–1600.

EPA-USA (1980). Ambient water quality criteria for chromium, Washington DC, US *Environmental Protection Agency*, A1-C48

Varó, I., Navarro, J. C., Amat, F. y Guilhermino, L. (2002). Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 48, 563–569.

Varó, I., Redón, S., Garcia-Roger, E. M., Amat, F., Guinot, D., Serrano, R. y Navarro, J. C. (2015). Aquatic pollution may favor the success of the invasive species. *Aquatic Toxicology*, 161, 208–220.

Weichert, F. G., Floeter, C., Meza, A. S. y Kammann, U. (2017). Chemosphere Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances e Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. *Chemosphere*, 186, 43–50.

Welden, N. (2019). Microplastics: Emerging Contaminants Requiring Multilevel Management. *Waste: a Handbook for Management*.

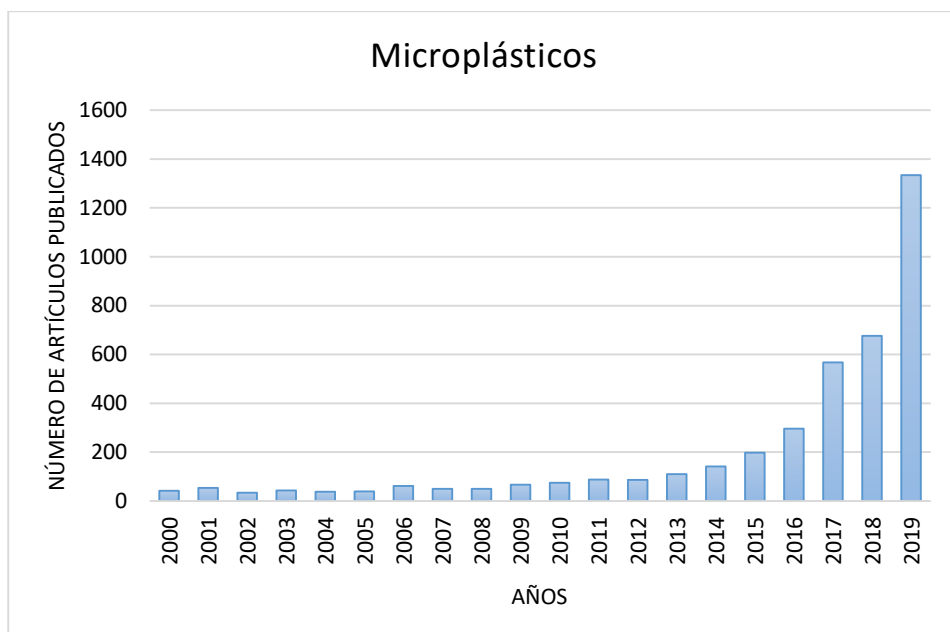
WHO. (2019). World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List, 2019. Consultado el 15 de julio de 2019, en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>

Witter, R. F. (1963). Measurement of blood cholinesterase. *Archives of Environmental Health*, 6, 99–125.

- WORMS. (2019). World Register of Marine Species. Consultado el 29 de octubre de 2019, en <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=480246>
- Yan, M., Nie, H., Xu, K., He, Y., Hu, Y., Huang, Y. y Wang, J. (2019). Microplastic abundance, distribution and composition in the Pearl River along Guangzhou city and Pearl River estuary, China. *Chemosphere*, 217, 879–886.
- Yoshimura, R., Yanagihara, N., Terao, T., Minami, K., Toyohira, Y., Ueno, S., Abe, K., y Izumi, F. (1998). Inhibits ion channel-mediated catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *Psychopharmacology*, 135(4), 368–373.
- Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W. y Zhao, Y. (2018). Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquatic Toxicology*, 28–36.
- Zhang, J., Zhang, C., Deng, Y., Wang, R., Ma, E., Wang, J., Zhou, Y. (2019). Microplastics in the surface water of small-scale estuaries in Shanghai. *Marine Pollution Bulletin*, 149(2360), 110569.

ANEXO I

La búsqueda en la base de datos Science direct usando la palabra clave: “microplastics”. El resultado de esta búsqueda ha sido de 553 artículos científicos publicados en el período 2000 a 2010 y 3486 artículos científicos de 2000 al 27 de noviembre de 2019. Como se muestra en la gráfica 1, el interés de la investigación en microplásticos comenzó a crecer sustancialmente a partir de 2012, cuando el número de publicaciones aumentó de 86 en 2012 a 110 en 2013. Este crecimiento ha continuado aumentando exponencialmente hasta la actualidad.



Gráfica 1: Tendencia temporal de artículos científicos sobre microplásticos.

ANEXO II

Tabla 1: valores de los parámetros físico-químicos en el medio acuoso durante las 48 horas de duración del ensayo con simvastatina.

Concentración SIMVASTATINA	Acuario	Tiempo de ensayo (h)	pH	Oxígeno disuelto (%)	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)
Control (Agua de Mar)	1	0	7,62	93,1	49,01	21,06
		24	7,57	80,6	48,93	21,08
		0*	7,61	94,1	48,56	21,12
		24**	7,48	79,5	49,01	20,96
Control 2 (Acetona)	4	0	7,60	96,4	49,12	20,98
		24	7,49	89,1	48,36	20,95
		0*	7,61	93,5	49,29	21,07
		24**	7,50	79,6	49,03	21,02
5,80 mg/L	7	0	7,58	90,7	49,08	20,94
		24	7,54	79,8	49,29	20,96
		0*	7,62	95,9	48,89	21,10
		24**	7,58	86,8	48,75	21,15
6,96 mg/L	10	0	7,56	93,7	48,96	20,89
		24	7,49	76,5	49,35	21,10
		0*	7,60	89,9	49,28	20,99
		24**	7,49	75,4	48,76	21,19
8,35 mg/L	13	0	7,67	96,8	49,31	20,69
		24	7,59	79,6	48,90	21,03
		0*	7,60	93,8	48,97	20,87
		24**	7,49	86,9	48,79	21,09
10,03 mg/L	16	0	7,51	96,5	49,12	20,91
		24	7,59	81,3	49,25	21,08
		0*	7,60	94,1	49,06	20,98
		24**	7,58	89,6	49,19	21,20
12,03 mg/L	19	0	7,56	98,1	49,21	20,79
		24	7,62	87,6	49,32	21,19
		0*	7,48	89,8	48,97	21,00
		24**	7,55	79,9	49,59	21,15

* Medio del acuario renovado.

** 24 horas tras la renovación del medio.

Tabla 2: valores de los parámetros físico-químicos en el medio acuoso durante las 48 horas de duración del ensayo con simvastatina y microplásticos.

Concentración SIMVASTATINA Y MICROPLÁSTICOS	Acuario	Tiempo de ensayo (h)	pH	Oxígeno disuelto (%)	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)
Control (Agua de Mar)	1	0	7,59	96,2	48,92	21,05
		24	7,48	83,5	49,35	21,03
		0*	7,60	96,8	49,14	21,04
		24**	7,55	88,6	49,06	21,12
Control AC (Acetona)	4	0	7,62	96,7	49,27	21,06
		24	7,59	86,3	48,92	21,22
		0*	7,57	90,6	49,01	20,99
		24**	7,50	75,6	48,93	20,96
Control MP (Agua de mar y 0,26 mg/L)	7	0	7,61	93,5	48,99	20,87
		24	7,58	81,4	49,05	20,89
		0*	7,49	93,5	49,13	21,02
		24**	7,53	88,7	49,3	21,20
5,80 mg/L y 0,26 mg/L	10	0	7,59	91,5	48,91	20,09
		24	7,60	82,6	49,02	21,08
		0*	7,61	96,5	49,08	21,01
		24**	7,63	79,8	49,1	21,06
6,96 mg/L y 0,26 mg/L	13	0	7,59	96,8	48,98	21,12
		24	7,55	83,7	48,96	21,22
		0*	7,60	96,4	49,03	21,09
		24**	7,61	82,6	49,16	21,15
8,35 mg/L y 0,26 mg/L	16	0	7,62	94,3	49,15	20,87
		24	7,62	86,3	48,46	21,03
		0*	7,59	94,7	49,25	20,93
		24**	7,60	80,6	49,12	21,04
10,03 mg/L y 0,26 mg/L	19	0	7,55	96,4	49,63	20,69
		24	7,59	79,3	48,97	21,00
		0*	7,60	90,5	48,92	20,85
		24**	7,51	83,4	49,36	20,93
12,03 mg/L y 0,26 mg/L	22	0	7,58	89,6	48,96	21,10
		24	7,60	76,9	48,79	21,20
		0*	7,61	91,5	48,95	21,06
		24**	7,54	72,6	49,21	21,18

* Medio del acuario renovado.

** 24 horas tras la renovación del medio.

Tabla 3: valores de los parámetros físico-químicos en el medio acuoso durante las 48 horas de duración del ensayo con carbamazepina.

Concentración CARBAMAZEPINA	Acuario	Tiempo de ensayo (h)	pH	Oxígeno disuelto (%)	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)
Control (Agua de Mar)	1	0	7,63	96,8	48,98	20,90
		24	7,45	79,5	49,06	21,24
		0*	7,55	98,1	48,88	21,00
		24**	7,52	76,2	48,90	20,96
Control AC (Acetona)	4	0	7,63	95,7	49,10	20,87
		24	7,52	79,6	49,01	20,98
		0*	7,59	96,6	48,61	20,79
		24**	7,63	79,1	48,20	21,12
25,16 mg/L	7	0	7,58	95,7	49,05	20,78
		24	7,46	83,2	49,06	20,00
		0*	7,57	97,4	49,00	20,79
		24**	7,53	79,6	48,78	20,91
30,14 mg/L	10	0	7,49	96,9	49,21	20,69
		24	7,58	76,1	49,23	21,06
		0*	7,56	98,3	48,66	21,14
		24**	7,45	79,7	48,94	20,87
36,17 mg/L	13	0	7,49	96,8	49,30	20,91
		24	7,53	78,6	49,22	21,06
		0*	7,52	97,5	49,36	20,94
		24**	7,49	77,1	49,25	21,17
43,40 mg/L	16	0	7,55	97,9	48,95	20,85
		24	7,47	75,4	49,01	20,45
		0*	7,55	96,5	49,22	21,22
		24**	7,50	78,3	49,37	20,76
52,08 mg/L	19	0	7,61	96,9	48,95	20,99
		24	7,60	76,2	49,08	20,65
		0*	7,59	95,8	48,99	20,55
		24**	7,55	77,3	48,75	21,01

* Medio del acuario renovado.

** 24 horas tras la renovación del medio.

Tabla 4: valores de los parámetros físico-químicos en el medio acuoso durante las 48 horas de duración del ensayo con carbamazepina y microplásticos.

Concentración CARBAMAZEPINA Y MICROPLÁSTICOS	Acuario	Tiempo de ensayo (h)	pH	Oxígeno disuelto (%)	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)
Control (Agua de Mar)	1	0	7,51	90,3	49,65	20,55
		24	7,59	78,1	49,36	20,96
		0*	7,61	92,4	48,96	20,68
		24**	7,49	76,8	43,69	21,10
Control AC (Acetona)	4	0	7,59	93,6	49,35	21,06
		24	7,53	79,5	48,93	21,08
		0*	7,59	89,4	49,12	20,98
		24**	7,63	75,4	48,76	20,87
Control MP (Agua de mar y 0,26 mg/L)	7	0	7,57	92,4	49,36	21,09
		24	7,52	80,1	48,96	21,16
		0*	7,49	90,9	48,29	21,00
		24**	7,61	82,4	49,36	21,05
25,16 mg/L y 0,26 mg/L	10	0	7,59	95,1	48,89	20,59
		24	7,60	89,6	49,35	20,96
		0*	7,61	93,6	48,79	20,68
		24**	7,59	82,6	48,96	20,87
30,14 mg/L y 0,26 mg/L	13	0	7,49	95,2	49,25	20,79
		24	7,50	79,6	49,24	20,63
		0*	7,59	91,6	48,36	20,98
		24**	7,63	76,9	48,87	20,95
36,17 mg/L y 0,26 mg/L	16	0	7,55	90,7	49,28	21,06
		24	7,63	79,6	49,78	21,18
		0*	7,61	88,3	49,16	21,13
		24**	7,50	76,1	48,95	21,09
43,40 mg/L y 0,26 mg/L	19	0	7,49	89,3	49,36	21,09
		24	7,52	80,1	49,01	21,10
		0*	7,57	96,5	49,22	21,05
		24**	7,61	82,9	49,37	20,95
52,08 mg/L y 0,26 mg/L	22	0	7,63	93,1	48,95	20,99
		24	7,50	84,8	49,08	20,93
		0*	7,59	96,1	48,99	21,05
		24**	7,62	89,6	48,75	21,07

* Medio del acuario renovado.

** 24 horas tras la renovación del medio.