

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Evaluación del potencial de asimilación digestiva de  
nanoplásticos**

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Ivonne Pintor Montalvo**

Ensenada, Baja California, México  
2021

Tesis defendida por  
**Ivonne Pintor Montalvo**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
Director de tesis

Miembros del comité

**Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández**

**Dra. María Teresa Viana Castrillón**

**Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra**



---

**Dr. José Manuel Romo Herrera**  
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

*Ivonne Pintor Montalvo © 2021*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Ivonne Pintor Montalvo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

### **Evaluación del potencial de asimilación digestiva de nanoplásticos**

Resumen aprobado por:

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
**Director de tesis**

En los últimos años, los nanoplásticos han empezado a ser considerados contaminantes muy importantes en los océanos, ya que han atraído la atención de la comunidad científica. Los plásticos a escala nanométrica pueden provenir de dos fuentes, ya sea por la degradación y abrasión de piezas de plástico o presentar ese tamaño desde su fabricación. La omnipresencia de estos nanomateriales pone sobre la mesa la necesidad de estudiar el impacto ambiental que puedan tener en diferentes ecosistemas. Uno de los que más preocupación han generado es el ecosistema marino, ya que es una buena fuente de alimentos para el humano. De los organismos que pueden verse afectados directamente por la interacción con los micro y nanoplásticos están los detritivos, como el camarón. Para conocer el efecto de los nanoplásticos en la especie del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, se expusieron 24 camarones durante 33 días a concentraciones de 0, 0.25, 0.5 y 1 mg/g de NanoPET. Se prepararon las dietas para los camarones y se le añadieron nanoplásticos que etiquetados con Rojo Nilo con la intención de confirmar su presencia en el alimento. Se analizaron la hemolinfa y los hepatopáncreas de los organismos. Se evaluaron los niveles de glucosa, proteína total, colesterol y triglicéridos en la hemolinfa de los camarones. También, se midieron los niveles de nitritos y de ROS en el hepatopáncreas. Finalmente, se evaluó la expresión relativa de los genes referentes al sistema antioxidante (SOD, CAT, GPx y GST). Se detectó estrés agudo en la hiperglucemia de la hemolinfa. Los genes SOD, CAT y GPx también mostraron señales de activación del sistema antioxidante en los organismos expuestos a las concentraciones 0.5 y 1 mg/g de NanoPET. Esto permitió que hubiera una inhibición en la producción de ROS. Se registró una activación del sistema antioxidante derivado de la inflamación detectada en las células del hepatopáncreas de los camarones expuestos al NanoPET contenido en los alimentos.

**Palabras clave: nanoplásticos, PET, camarón blanco, hemolinfa, hepatopáncreas, hiperglucemia, sistema antioxidante, estrés oxidativo.**

Abstract of the thesis presented by **Ivonne Pintor Montalvo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

### **Evaluation of the potential digestive assimilation of nanoplastics.**

Abstract approved by:

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
Thesis director

In recent years, nanoplastics have attracted the attention of the scientific community as very important pollutant in the oceans. Nanoscale plastics are originated from different sources, either from the environmental degradation and abrasion of plastic pieces, or by the direct manufacture of nanosized plastic material. The widespread presence of these nanomaterials rise the concern of their environmental impact on different ecosystems. Marine ecosystem, being an important food source for humans, is one of the most affected. Among the organisms that can be directly affected by the interaction with micro and nanoplastics are detritus scavengers, such as shrimp. In order to know the effect of nanoplastics on the Pacific white shrimp species *Litopenaeus vannamei*, were feed for 33 days with a feed containing different concentrations of NanoPET (0, 0.25, 0.5 and 1 mg/g). The nanoplastics were labelled with Red Nile with the intention of confirming their presence in the food. Hemolymph and hepatopancreas tissues from the organisms were analyzed. Glucose, total protein, cholesterol and triglycerides levels were evaluated in shrimp hemolymph. In addition, nitrite and ROS levels in the hepatopancreas were measured. Finally, the relative gene expression of some antioxidant proteins (SOD, CAT, GPx and GST) was evaluated. Acute stress was detected in the hyperglycemia of hemolymph, inhibition of nitrites as affectation in the immune system and presence of ROS in the concentrations of 0.25 and 0.5 mg/g NanoPET. The SOD, CAT and GPx genes showed signs of antioxidant system activation in organisms exposed to the 0.5 and 1 mg/g concentrations of NanoPET. The activation fo these genes inhibited the production of ROS. An activation of the antioxidant system derived from the inflammation was also detected in the hepatopancreas tissue of shrimp feed with a diet containing NanoPET.

**Keywords:** nanoplastics, PET, white shrimp, haemolymph, hepatopancreas, hyperglucemia, antioxidant system, oxidative stress.

## Dedicatoria

---

**A mi numerosa familia**

*<<Antes que el tiempo se acuñara en días,  
el mar, el siempre mar, ya estaba y era.>>*

*Extracto de El Mar, de Jorge Luis Borges*

## Agradecimientos

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por aportarme una beca de estudios para realizar la maestría, con número de registro 832161

Al proyecto Sistema Nacional de Evaluación Nanotoxicológica (SINANOTOX) Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales (CONACyT PN 4710) 2018

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) y al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por abrirme las puertas para realizar un posgrado. A mis profesores y al personal que laboran en los centros por su apoyo durante mi formación académica.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por abrirme las puertas para poder llevar a cabo gran parte del trabajo experimental y base de este proyecto.

Al Dr. Rafael Vásquez Duhalt por su constante apoyo y enseñanza, por aceptarme como parte de su grupo de investigación y por encontrar todos los medios para que la realización de este proyecto de investigación fuera posible.

Agradezco a las integrantes del comité de tesis por su valioso tiempo y aportaciones para la realización de este proyecto. A la Dra. María Teresa Viana Castrillón por abrirme las puertas de su laboratorio en el IIO y por guiarme en la realización de este proyecto permitiendo que cada duda quedara resuelta y cada aspecto fuera cubierto a lo largo de la experimentación. A la Dra. M. del Pilar Saavedra por sus acertadas sugerencias y sus enriquecedoras aportaciones para este trabajo. Finalmente, a la Dra. Ana Guadalupe Rodríguez por todo el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio, por su paciencia y por llevarme de la mano para la realización de la parte experimental. Muchas gracias doctoras.

A Laura Rosales por el constante acompañamiento desde el día 1 y por todo el apoyo para la realización de todo tipo de trámite CNyN/CICESE

Al grupo de trabajo del laboratorio de Nutrición y Fisiología del IIO, a Auro, Alonso, Eugenio, Félix, André, Aketzali, Jaz y Abraham por su apoyo, compañía, tiempo y ayuda. Por todo el trabajo manual, por los buenos momentos en el laboratorio y por aclarar mis incontables dudas una y otra vez. Gracias eternas.

Al Dr. Oscar del Río por el apoyo para la extracción y análisis bioquímico de la hemolinfa.

Al Dr. Antonio Mata por todo el apoyo en el laboratorio, por sus clases de genética, por resolver mis incontables dudas y por la realización de los experimentos moleculares que sustentan el presente trabajo.

Gracias a los bionanos y personal del laboratorio de Bionano que me apoyaron cuando tuve que hacer las mediciones en el CNYN.

Agradezco a mi familia completa Pintor y Montalvo, así como a todos mis amigos por acompañarme durante este recorrido. Agradezco a mis compañeros de generación por el tiempo compartido y las enseñanzas que me compartieron.

Agradezco enormemente a María, Javier y Javito, mis papás y hermano. Ellos son, han sido y seguirán siendo mi más grande apoyo y pilares en mi vida. Gracias por creer en mí y por dotarme de sus nobles enseñanzas. Los amo para siempre

Gracias infinitas a mi casera la Sra. Lupita Martínez y a su familia por regalarme un hogar en Ensenada. Gracias por toda la paciencia, el cariño y el cuidado, siempre estaré agradecida con usted.

Finalmente quiero agradecer a Ivonne Julieta, Luis Enrique, Laura Karina y Jesús Alberto por regalarme la vida de cuadrito llena de aventuras en este posgrado llamado vida. Gracias por ser los mejores amigos del mundo, soy la más afortunada por haberlos conocido. Me enseñaron mucho y sepan que trajeron un montón de amor y cambios positivos a mi vida.

Gracias Jesús por tanto amor y paciencia, por crecer conmigo y por recordarme la belleza de lo simple.

## Tabla de contenido

---

<b>Resumen en español.....</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen en inglés.....</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>xii</b>
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tereftalato de polietileno .....	2
1.2 Nanoplásticos .....	2
1.3 Camarón blanco del Pacífico (Litopenaeus vannamei) .....	5
1.4 Sistema Inmune de los crustáceos .....	5
1.5 Sistema digestivo de los crustáceos.....	6
1.6 Agenda 2030 para el Desarrollo Sustentable.....	7
1.7 Antecedentes .....	8
1.8 Justificación .....	10
1.9 Hipótesis.....	11
1.10 Objetivos .....	11
1.10.1 Objetivo general.....	11
1.10.2. Objetivos específicos.....	11
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>12</b>
2.1 Síntesis de nanopartículas plásticas de tereftalato de polietileno (PET) .....	12
2.2 Preparación de dieta con nanoplásticos para camarón.....	13
Dieta NanoPET 0 mg/g .....	14

Dieta NanoPET 0.25 mg/g .....	14
Dieta NanoPET 0.5 mg/g .....	14
Dieta NanoPET 1 mg/g .....	14
2.3 Cultivo de camarones en un sistema de recirculación de agua .....	16
2.3.1 Calidad del agua .....	17
2.4 Ensayo experimental .....	18
2.5 Toma de muestras de los camarones blancos ( <i>L. vannamei</i> ) .....	19
2.6 Análisis bioquímicos .....	20
2.6.1 Variables bioquímicas en hemolinfa .....	20
2.6.2 Análisis bioquímico en hepatopáncreas.....	22
2.6.2.1. Nitritos totales.....	22
2.6.2.2. Especies Reactivas de Oxígeno.....	23
2.7 Extracción ADN genómico .....	23
2.7.1 Purificación de ARN .....	23
2.7.2 Cuantificación de la expresión genética.....	24
2.8 Análisis estadístico .....	25
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>	<b>26</b>
3.1 Síntesis de nanopartículas de tereftalato de poliestireno .....	26
3.2 Preparación de dieta con nanoplásticos para camarón.....	28
3.2.1 Alimento con concentración 0 mg/g de NanoPET .....	29
3.2.2. Alimento con concentración 1 mg/g de NanoPET .....	32
3.3 Ensayo preliminar.....	34
3.4 Calidad de agua .....	34
3.5 Ensayo experimental.....	35
3.6 Toma de muestras de los camarones blancos ( <i>L. vannamei</i> ) .....	37

3.7 Variables químicas en hemolinfa ..... 39

3.8 Concentración de nitritos en hepatopáncreas..... 41

3.9 Especies Reactivas de Oxígeno en el hepatopáncreas..... 42

3.10 Extracción deADN genómico..... 42

**Capítulo 4. Discusión .....45**

**Capítulo 5. Conclusiones .....50**

**Literatura citada .....51**

## Lista de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Molécula polimérica de tereftalato de polietileno .....	2
<b>Figura 2.</b> Degradación de plástico.....	4
<b>Figura 3.</b> Camarón blanco <i>L. vannamei</i> .....	5
<b>Figura 4.</b> Sistema digestivo del camarón <i>L. vannamei</i> .....	7
<b>Figura 5.</b> 17 objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU .....	8
<b>Figura 6.</b> Cuerdas de alimento húmedo.....	15
<b>Figura 7.</b> Pellets de dieta de camarón.....	15
<b>Figura 8.</b> Sistema de cubetas en el invernadero del IIO. ....	16
<b>Figura 9.</b> Reservorio de agua del sistema de recirculación de cubetas con el biofiltro.....	17
<b>Figura 10.</b> Distribución aleatoria de tratamientos.....	19
<b>Figura 11.</b> Toma de muestra de hemolinfa.....	20
<b>Figura 12.</b> A) Diámetro determinado por dispersión dinámica de luz y B) Micrografía de TEM que muestra el tamaño de los agregados obtenidos durante la síntesis .....	26
<b>Figura 13.</b> Fluorescencia detectada en nanopartículas plásticas de PET disueltas en agua destilada. ....	27
<b>Figura 14.</b> Fluorescencia detectada en nanopartículas plásticas de PET disueltas en etanol. ....	29
<b>Figura 15.</b> Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 0 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol (70%) medida en el rango de 515/585. ....	30
<b>Figura 16.</b> Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 0 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol medida en el rango de 558/636.....	31
<b>Figura 17.</b> Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 1 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol medida en el rango de 515/585.....	32
<b>Figura 18.</b> Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 1 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol medida en el rango de 558/636.....	33
<b>Figura 19.</b> Los resultados representan el promedio del peso inicial de los organismos de cada tratamiento de NanoPET. ....	36

<b>Figura 20.</b> Los resultados representan el promedio del longitud inicial de los organismos de cada tratamiento de NanoPET.....	36
<b>Figura 21.</b> Los resultados representan el promedio del porcentaje del aumento de peso de los organismos de cada tratamiento de NanoPET. ....	38
<b>Figura 22.</b> Los resultados representan el promedio del porcentaje de ganancia de longitud de los organismos de cada tratamiento de NanoPET.....	39
<b>Figura 23.</b> Cuantificación de la concentración de proteína total y glucosa en la hemolinfa de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET.....	40
<b>Figura 24</b> Cuantificación de la concentración de triglicéridos y colesterol en la hemolinfa de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET.....	40
<b>Figura 25</b> Cuantificación de la concentración de nitritos totales, se reportan en $\mu\text{mol}/\text{gramo}$ de hepaotopáncreas, en el hepatopáncreas de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET.. ....	41
<b>Figura 26.</b> Cuantificación de la concentración de ROS con respecto a la proteína total en el hepatopáncreas de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET.....	42
<b>Figura 27.</b> Cuantificación de la calidad del RIN en el hepatopáncreas de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET.....	43
<b>Figura 28.</b> Efectos de nanoplásticos de PET en la expresión genética de estrés oxidativo en camarón blanco del Pacífico. A) Expresión genética de Superóxido dismutasa ( <i>SOD</i> ). B) Expresión genética de Catalasa ( <i>CAT</i> ). C) Expresión genética de Glutation peroxidasa ( <i>GPx</i> ). D) Expresión genética de Glutation-s-transferasa ( <i>GST</i> ).....	44

## Lista de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de polímeros .....	2
<b>Tabla 2.</b> Definiciones de nanoplásticos de Mendoza, et al. 2018.....	3
<b>Tabla 3.</b> Ingredientes utilizados para la formulación de dietas para alimentar al camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> , con diferentes concentraciones de nanopartículas de PET. ....	13
<b>Tabla 4.</b> Mezcla maestra .....	24
<b>Tabla 5.</b> Ciclos en el termociclador. ....	24
<b>Tabla 6.</b> Se indican los pares de oligonucleótidos utilizados para las secuencias de cebadores q-PCR, los tamaños de los amplicones en pares de bases (bp), las eficiencias de reacción (E) y los coeficientes de determinación de Pearson (R2).....	25
<b>Tabla 7.</b> Emisión de fluorescencia de NanoPET disuelto en agua.....	27
<b>Tabla 8.</b> Emisión de fluorescencia de NanoPET disuelto en etanol (70%).....	29
<b>Tabla 9.</b> Evaluación de fluorescencia del alimento 0mg/g de NanoPET, con excitación a 515 nm y emisión a 585 nm. ....	30
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de fluorescencia del alimento alimento 0mg/g de NanoPET, con excitación a 558 nm y emisión a 636 nm.....	31
<b>Tabla 11.</b> Evaluación de fluorescencia del alimento con 1 mg/g de NanoPET con excitación a 515 nm y emisión a 585 nm.....	32
<b>Tabla 12.</b> Evaluación de fluorescencia del alimento con 1 mg/g NanoPET, con excitación a 558 nm y emisión a 636 nm. ....	33
<b>Tabla 13.</b> Parámetros de calidad de agua del bioensayo.....	35
<b>Tabla 14.</b> Pesos y longitudes promedio de camarones blancos al finalizar el bioensayo. ....	37

## Capítulo 1. Introducción

---

El término plástico se refiere a cualquier material que contenga un polímero como su ingrediente esencial y que sea reforzado con aditivos que lo ayuden a ser más resistente o le brinden una característica específica como pigmentos, estabilizadores o retardantes de llamas (Hirt y Body-Malapel, 2020). Los plásticos se pueden clasificar de diversas formas, en este caso, los clasificaremos de acuerdo a sus propiedades térmicas obteniendo dos grandes categorías: los termoplásticos y los termoestables (Tabla 1) (Plastic Europe, 2020).

Los polímeros termoestables son un grupo de plásticos que sufren un cambio químico cuando son llevados a altas temperaturas y una vez que han sido calentados y moldeados no pueden ser derretidos con el fin de volver a moldearse. Este tipo de materiales adquieren un estado final reticulado haciéndolos insolubles y negando la capacidad de que estos se fundan, impidiendo un reciclado del material (Bruder y Bruder, 2015).

Los termoplásticos son una familia de polímeros que se funden cuando se calientan y se endurecen cuando se enfrían. Este tipo de materiales tiene la capacidad de ser calentado, moldeado y enfriado en repetidas ocasiones. Estos polímeros tienen una estructura química lineal, la cual puede presentar ramificaciones, o no; esta característica les permite ser solubles en solventes orgánicos dando a estos materiales la capacidad de ser fundidos y reciclados (Bruder y Bruder, 2015).

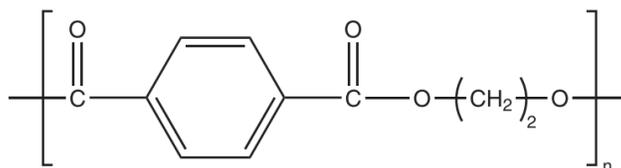
Gracias a la versatilidad que el plástico ofrece, tan solo para el 2019 se produjeron en el mundo casi 368 millones de toneladas de plástico (Plastic Europe, 2020). Hoy en día el plástico es considerado el desecho más común de los ecosistemas marinos, siendo el contaminante que representa el 75% de la basura marina, del cual el 80% de este plástico proviene de fuentes terrestres y el resto son desperdicios de actividades desarrolladas en el mar como la pesca y el transporte marino (Henderson y Green, 2020). La alta demanda de productos plásticos, las actividades en altamar y la deficiente gestión de residuos plásticos ha generado un grave problema ambiental que impacta directamente ecosistemas terrestres y marinos (Jambeck et al., 2015).

**Tabla 1.** Ejemplos de polímeros

Termoplásticos	Termoestables
Poliétileno (PE)	Poliuretano (PUR)
Polipropileno (PP)	Resinas epóxicas
Policloruro de vinilo (PVC)	Resina de melamina
Tereftalato de polietileno (PET)	Ésteres de vinil
Poliestireno (PS)	Silicona
Policarbonato (PC)	Resinas acrílicas, fenólicas y formaldehídicas

## 1.1 Tereftalato de polietileno

De acuerdo a Geyer en el 2015 se produjeron 33 millones de toneladas métricas de tereftalato de polietileno (PET) a nivel mundial y se desecharon 32 millones de toneladas métricas (Geyer et al., 2017), dejándonos con un alto índice de generación de desechos. La popularidad de este plástico favorece la producción de empaques como botellas, películas y empaques para comida. En el periodo del 2002 al 2014 del 100% de producción de polímeros, 44.8% fue dedicado exclusivamente para el sector de embalaje y empaquetado, cubierto por polietileno (PE), polipropileno (PP) y PET (Pongrácz, 2010).



**Figura 1.** Molécula polimérica de tereftalato de polietileno. Figura tomada de Baur et al., 2019.

## 1.2 Nanoplásticos

La cotidianeidad en el uso del plástico resulta en un constante tránsito de basura plástica hacia el océano. Como se mencionó previamente la contaminación marina por los desechos plásticos es capaz de desencadenar un sinfín de impactos ambientales y biológicos. Cuando los polímeros se exponen de manera prolongada a factores ambientales como humedad, calor, luz solar y acción

microbiana, la degradación de los polímeros comienza, orillando a que estos se degraden en partículas de menor tamaños. Lamentablemente, la falta de métodos experimentales estandarizados limita el conocimiento sobre el tiempo exacto de degradación de plásticos (Chamas et al., 2020).

En la última década se ha reportado que la degradación de materiales como plástico es capaz de formar micro y nanoplásticos (Cai et al., 2021). Estas partículas se consideran contaminantes ambientales que interfieren de manera directa en el equilibrio oceánico pues la contaminación por plásticos es un estresor más para el océano, aunado a la acidificación del océano y el calentamiento global (Oliveira et al., 2019).

La mayor característica de las nanopartículas es que muestran por planos atómicos determinantes que no son comunes o que por lo regular no están superficialmente presentes en las superficies de materiales volumétricos (Banfield y Zhang, 2001). En general, la razón por la que los nanomateriales son sujetos a mucha investigación científica es porque pueden llegar a desarrollar un comportamiento muy diferente al del material del que provengan (Wigginton et al., 2007).

Fue en 1960 cuando se descubrieron partículas plásticas dentro del estómago de un albatros, pero fue hasta 1987 cuando se realizó la primera publicación científica hablando de la relación que existía entre las aves y la basura plástica del mar (Schmid et al., 2021). Al día de hoy la definición de nanoplástico aún no está del todo establecida y es que, en la publicación de Rios Mendoza et al. (2018), se mencionan los tamaños de las nanopartículas propuestas por diferentes autores (Tabla 2), sin embargo, la definición adoptada en su mayoría es la de nanomaterial reconocida por la Comisión Europea (1-100 nm).

**Tabla 2.** Definiciones de nanoplásticos de Mendoza, et al. 2018

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Tamaño</b>
Wagner, et al.	2014	<20 $\mu\text{m}$
Bergmann, et al.	2015	<100 nm
da Costa, et al.	2019	<1 $\mu\text{m}$

Los nanoplásticos marinos tienen dos orígenes: primarios y secundarios. Primarios son aquellos que fueron fabricados de un tamaño nanométrico por ejemplo, los productos de limpieza, higiene o belleza (Erni-cassola et al., 2017). Los secundarios son aquellos que suelen tener un comportamiento coloide y que han sido degradados por foto-degradación, abrasión mecánica (Figura 2), degradación foto-oxidativa o hidrólisis (Amir et al., 2021). La Figura 2 fase 1 muestra un ejemplo de una bolsa plástica completa. La fase 2 refleja la pérdida de la integridad física del polímero. La fase 3 sugiere que el material al ser degradado se va dividiendo de manera no homogénea en partículas de un tamaño cada vez menor hasta que al llegar a la fase 4 la apreciación de algunas de estas partículas es con ayuda de instrumentos con capacidad de aumentar la definición óptica de las mismas para poder ser detectadas ocularmente.



**Figura 2.** Degradación de plástico. 1) Objeto plástico completo. 2) Comienza la pérdida de integridad física del objeto. 3) Las partículas que formaban el objeto ya no se encuentran integradas. 4) Es posible apreciar partículas microscópicas.

Diversos autores describieron como el tamaño de los nanoplásticos implica un riesgo de ser ingerido por animales marinos y que se integren a la cadena trófica, ya que los nanoplásticos son capaces de atravesar barreras biológicas y acumularse en tejidos y órganos, afectando el metabolismo y la asimilación de nutrientes (Lehner et al., 2019).

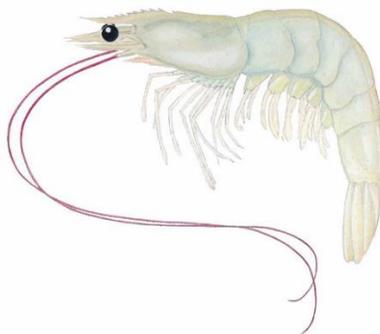
Otros ejemplos que citan Oliveira et al. (2019) con respecto al potencial daño ocasionado por el reducido tamaño de estas micro y nanopartículas plásticas son: inducir disminuciones en las tasas de alimentación y reproducción del zooplancton, concentrar contaminantes ambientales, modificar la distribución, la biotransformación y los efectos de otros contaminantes ambientales (por ejemplo, productos farmacéuticos) tras la exposición simultánea. También, se ha informado que inducen

genotoxicidad y neurotoxicidad en peces y mejillones, promueven alteraciones del comportamiento y causan alteración endocrina en peces.

### 1.3 Camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Figura 3) es originario de la costa oriental del Océano Pacífico, desde el estado de Sonora hasta Perú, se localiza en hábitats marinos tropicales. Son organismos que tienen un cuerpo alargado que consta de tres divisiones principales: cefalotórax, abdomen y cola. Suelen ser de color blanco translúcido con algunos tonos amarillos, mientras que sus antenas, patas delanteras y cola suelen tener un ligero tono rojizo (INAPESCA, 2012, FAO, 2018).

De acuerdo con la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) en el reporte estadístico del 2018, el camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) acumuló una producción de 4,966,241 toneladas, durante ese año, a nivel mundial.



**Figura 3.** Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Imagen tomada de climapesca.org

### 1.4 Sistema Inmune de los crustáceos

Los crustáceos poseen un sistema inmune innato, como la mayoría de los invertebrados. El primer sistema de protección ante posibles amenazas del exterior es su exoesqueleto. A nivel interno el tracto digestivo, que también funciona como vía de entrada para posibles agentes invasores, se

encuentra recubierto de quitina propiciando un ambiente ácido lleno de enzimas que permite eliminar o neutralizar posibles agentes patógenos (Abud, et al., 2008).

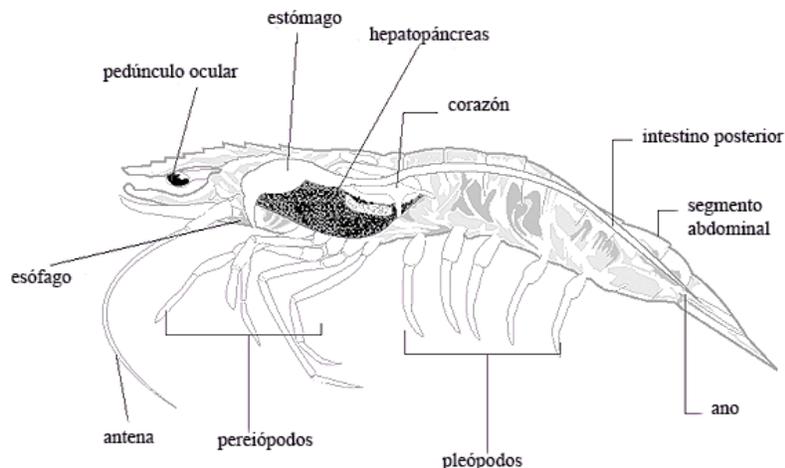
Cuando un camarón es atacado por un agente patógeno se desencadenan una serie de reacciones inmunológicas que se dividen en celulares y humorales. Las respuestas celulares son reguladas por los hemocitos, las células de la hemolinfa, y las respuestas humorales se componen de macromoléculas o radicales intermediarios altamente reactivos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (ERN).

La formación de ROS sucede cuando las células al detectar un agente estresor aumentan su consumo de oxígeno, dando pie a la reducción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) a anión superóxido ( $O_2^-$ ), este ión funciona como precedente de peróxido ( $H_2O_2$ ), radical hidóxilo ( $OH\bullet$ ) y otras moléculas capaces de dañar la célula. El origen de las ERN recae en la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que se encuentra en diversas células, así como las del sistema inmunológico. La enzima NOS es inducida por agentes estresores produciendo óxido nítrico (NO), un compuesto con potencial microbicida. El NO es muy inestable y se transforma rápidamente en nitritos ( $NO_2$ ) y nitratos ( $NO_3$ )

Debido a la capacidad reactiva que los ROS y ERN tiene, pueden destruir agentes invasores, pero también pueden implicar un daño para los camarones, en este caso el sistema antioxidante del organismo activará a las enzimas antioxidantes capaces de neutralizar ROS como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Abud, et al., 2008).

## **1.5 Sistema digestivo de los crustáceos**

El sistema digestivo de los crustáceos cumple la función principal de nutrir al organismo. Esta actividad se divide en: ingesta, transporte de nutrientes, digestión, absorción, almacenamiento de nutrientes y excreción. El tracto digestivo se divide en 5 secciones: boca, esófago, estómago, glándula digestiva (hepatopáncreas) y el intestino anterior, medio y posterior (Ceccaldi, 1989) (Figura 4).



**Figura 4.** Sistema digestivo del camarón *L. vannamei*. Imagen modificada tomada de FAO, 2001

El hepatopáncreas es un órgano de gran tamaño, pues puede llegar a representar 2-6% del peso del camarón (Ceccaldi, 1989). Este órgano se encuentra en el lado dorsal del cefalotórax y puede extenderse hacia atrás en dirección del abdomen. La importancia del hepatopáncreas radica en que aquí se lleva a cabo la digestión intracelular, en donde la actividad enzimática rompe las moléculas al tamaño necesario que puedan absorber los nutrientes y agua (McGaw y Curtis, 2012). Se sabe que el hepatopáncreas funciona como un filtro ya que solo permite el paso de líquidos y partículas con un diámetro menor a 100 nm (Hopkin y Nott, 1980).

## 1.6 Agenda 2030 para el Desarrollo Sustentable

La Asamblea General de la Organización de las Naciones Unidas adoptó en septiembre del 2015 la Agenda 2030 para el Desarrollo Sustentable, con la intención de desarrollar un plan de acción a favor de las personas el planeta y la prosperidad. Para poder llevar a cabo el cumplimiento de esta Agenda se propusieron 17 objetivos (Figura 5) con 169 metas de carácter integrado abarcando las áreas económicas, sociales y ambientales.



Figura 5. 17 objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU. Imagen tomada de (ONU, 2015)

El objetivo 14 ‘Vida Submarina’ y sus 10 metas anexas (14.1 – 14.c) son esenciales para la prevención y mitigación de la contaminación marina. La meta que sustenta el desarrollo del proyecto es la 14.a y esta cita lo siguiente:

*Aumentar los conocimientos científicos, desarrollar la capacidad de investigación y transferir tecnología marina, teniendo en cuenta los Criterios y Directrices para la Transferencia de Tecnología Marina de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental, a fin de mejorar la salud de los océanos y potenciar la contribución de la biodiversidad marina al desarrollo de los países en desarrollo, en particular los pequeños Estados insulares en desarrollo y los países menos adelantados (ONU, 2015).*

Este proyecto contribuye al cumplimiento de la Agenda 2030 estudiando el impacto ambiental que los nanoplasticos ocasionan a ciertas especies marinas en el océano.

## 1.7 Antecedentes

En el año 2015 comenzó a especularse que las partículas plásticas menores a 1µm podían estar presentes en el medio ambiente (Wagner y Reemtsma, 2019). De acuerdo con (Piccardo et al., 2020)

para febrero del 2020 y a partir del 2012, se encontraron cerca de 184 publicaciones sobre nanoplásticos en PubMed. En el 97% de las publicaciones se hicieron estudios con el poliestireno (PS). Lo cual también sesga un poco la investigación con respecto a otros polímeros como el tereftalato de poliestireno que es polímero que se aborda en este proyecto.

Aunque ya hay muchos estudios que tratan sobre la exposición de los organismos marinos a distintas concentraciones de micro y nanoplásticos, vale la pena direccionar esta investigación para conocer los efectos sobre el balance de estrés oxidativo y sistema antioxidante en los camarones expuestos a nanoplásticos.

Para evaluar el sistema antioxidante Yu et al. (2018) expusieron a organismos juveniles de la especie *Eriocheir sinensis* a distintas concentraciones de microplásticos (5  $\mu\text{m}$ ) de PS durante 21 días. Durante ese tiempo se evaluó la calidad del agua, junto con la ganancia de peso y longitud de los organismos. Además de evaluar la expresión genética de los genes SOD, CAT, GPx y GST. Dichos autores demostraron que los microplásticos se acumularon en el tejido de los cangrejos afectando de manera significativa su desarrollo y crecimiento. Además de que se reportó que los microplásticos de PS fueron capaces de inducir estrés oxidativo en el hepatopáncreas del cangrejo *Eriocheir sinensis*.

En otro estudio realizado por Li et al. (2020) llevaron a cabo un ensayo nanopartículas plásticas de PS con un tamaño de 75 nm, se manejaron las concentraciones 5, 10, 20 y 40 mg/L. Los crustáceos de la especie *Macrobrachium nipponense* se sometieron a exposición crónica durante 28 días a 4 concentraciones comparadas con un control. El grupo control no fue expuesto a nanoplásticos en el agua. Se realizó una comparativa de peso y longitud de los organismos al inicio y final del bioensayo. También se evaluó la expresión genética de SOD, CAT, GPx y GST. Para conocer la activación del sistema antioxidante se evaluaron las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Se demostró que la exposición a nanoplásticos de PS desencadenó una alta producción de ROS y las concentraciones de 10, 20 y 40 mg/L causaron un severo daño en el sistema oxidativo al reducir la actividad de las enzimas antioxidantes, ocasionando efectos tóxicos en el organismo.

De acuerdo con Rodríguez-Hernández et al. (2019) se desarrolló un método para poder sintetizar de manera segura y eficaz nanopartículas plásticas de PET. Estos nanoplásticos fueron caracterizados por medio de FTIR y Rayos X, confirmando que el material del que provenían si era tereftalato de

polietileno otorgándoles el nombre de NanoPET. Con el fin de conocer los posibles efectos tóxicos en mamíferos, células macrófagas RAW-Blue fueron expuestas a NanoPET y se detectó por medio de TEM que estas nanopartículas lograban internalizarse en los macrófagos y formaban varias vesículas dentro de las células.

En el 2020, Aguilar-Guzmán realizó investigaciones *in vitro* con macrófagos murinos, exponiendo estas células a bajas concentraciones de NanoPET en cortos periodos. Con el fin de evaluar daños citotóxicos, se evaluaron los ROS de las células y también se hicieron pruebas genéticas de las células por medio de microarreglos. Se concluyó que la exposición de los macrófagos a NanoPET mostraba un incremento en la viabilidad celular que disminuye con el tiempo, así como aumento en la producción de ROS. Por otra parte, el análisis con microarreglos mostró una sobreexpresión en genes referentes a la remodelación de la estructura celular, la regulación proliferativa y apoptótica y la respuesta inflamatoria e inmune. Concluyendo que la célula detecta la presencia de las nanopartículas exógenas, activando procesos de inflamación celular que podrían ocasionar una apoptosis si la célula se expone por periodos largos de tiempo.

## **1.8 Justificación**

La importancia de ser responsable con la conservación del medio ambiente nos exhorta a detectar cuales son los riesgos y peligros que la exposición a los nanoplásticos es capaz de ocasionar en los crustáceos, ya que estos son de gran importancia nutricional y económica. La popularidad del camarón blanco recae enormemente en que es adecuado para la acuicultura intensiva, incluyendo un amplio grado de tolerancia a la sal y un rápido crecimiento. Debido a la gran producción de envases de plástico de un solo uso y por consecuencia, la alta generación de desechos de tereftalato de polietileno (PET) a nivel global, este proyecto de investigación se enfocó en evaluar los daños que los nanoplásticos de PET desencadenan en el sistema antioxidante del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Además de mantener como prioridad los posibles daños que los plásticos representan para la vida marina.

## 1.9 Hipótesis

La presencia de nanoplásticos de tereftalato de polietileno (PET) en el alimento podrán absorberse vía digestiva desencadenando efectos en el sistema antioxidante del hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

## 1.10 Objetivos

### 1.10.1 Objetivo general

Estudiar efectos en el sistema antioxidante asociado de la asimilación que las nanopartículas plásticas de tereftalato de polietileno (PET) presentes en el alimento causan en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

### 1.10.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la inclusión de nanopartículas de tereftalato de polietileno en la dieta suministrada para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Analizar el gradiente del perfil hemolítico del camarón *Litopenaeus vannamei* expresado por exposición a nanoplásticos de tereftalato de polietileno (PET).
- Cuantificar la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) como respuesta humoral del sistema inmune en el hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Evaluar la expresión de los genes del sistema antioxidante en el hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* activada por la exposición a nanoplásticos de tereftalato de polietileno (PET).

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Síntesis de nanopartículas plásticas de tereftalato de polietileno (PET)

De acuerdo al método desarrollado por Rodríguez-Hernandez et al. (2019) se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de PET. El PET se obtuvo directamente de envases hechos de este polímero por medio de abrasión mecánica. La base del envase fue tallada una cegueta de metal de manera unidireccional para prevenir el aumento en la temperatura del área. El polvo recolectado se tamizó (malla No. 35, Cole-Parmer Testing Sieve) hasta obtener partículas menores a 200  $\mu\text{m}$ . Una vez que se consiguió 1 g de polvo de PET se diluyó en 90% de ácido trifluoroacético (TFA) a 50°C y se agitó durante 2 h. Después de 24 h de agitación vigorosa a temperatura ambiente se agregó TFA al 20% y también se mantuvo en agitación durante 1 h. Con el fin de remover el ácido, la solución se centrifugó a 3500 rpm durante 20 min a 4°C.

Se resuspendieron las partículas en dodecilsulfato sódico (SDS 0.5%) y se ultrasonicaron (Ultrasonic homogenizator) con punta fina durante 10 min y con intervalos de 10 seg sonicación/descanso para impedir que la aglomeración entre partículas continúe. Para lograr que las partículas se separen por sedimentación se colocaron en una probeta de 1L y se dejaron sedimentar durante 24 h. Se extrajeron alícuotas desde diferentes niveles de la probeta y por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) se evaluó el tamaño de las nanopartículas.

Las nanopartículas plásticas de <200 nm fueron recuperadas y centrifugadas a 3500 rpm durante 20 min a 4°C para retirar el SDS y finalmente se lavaron, dos veces, con etanol al 70% para su almacenamiento. Una vez secas, las nanopartículas se mantuvieron en etanol al 70% hasta su uso.

Las nanopartículas plásticas de PET se etiquetaron con Rojo Nilo. Se tomó 1 mg/mL de NanoPET recuperado y se centrifugó durante 25 min a 16,800g, se descartó el sobrenadante y al precipitado de NanoPET se le agregó 1 mL de solución de Rojo Nilo (0.5% en DMSO). La mezcla se mantuvo en agitación constante un lapso de 24 h. a 200 rpm en la oscuridad para conservación del fluoróforo. Concluido el tiempo de agitación, las nanopartículas plásticas de PET se centrifugaron tres veces en una solución de etanol al 50% y PBS 1X (0.1 M).

## 2.2 Preparación de dieta con nanoplasticos para camarón

Se prepararon 4 dietas con diferentes concentraciones de nanopartículas de PET: 0, 0.25, 0.5 y 1 mg/g. Se prepararon 200g de dieta para camarón de acuerdo a la formulación descrita por (Araújo et al., 2020) (Tabla 3). Para una completa nutrición de los organismos marinos la base de la dieta se divide en micro y macronutrientes, en el que cada ingrediente aporta un porcentaje de nutrición.

**Tabla 3.** Ingredientes utilizados para la formulación de dietas para alimentar al camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, con diferentes concentraciones de nanopartículas de PET. (MA) se refiere a macronutriente y (MI) se refiere a micronutriente

NanoPET	0 mg/g	0.25 mg/g	0.5 mg/g	1 mg/g
Ingredientes	%	%	%	%
Harina de pescado (MA)	12.00	12.00	12.00	12.00
Harina de ave (MA)	22.00	22.00	22.00	22.00
Soya (MA)	18.00	18.00	18.00	18.00
Harina de trigo (MA)	8.00	8.00	8.00	8.00
Grenetina (MA)	6.00	6.00	6.00	6.00
Gluten de maíz (MA)	7.00	7.00	7.00	7.00
Sebo de res (MA)	2.02	2.02	2.02	2.02
Maicena (MA)	18.65	18.45	18.15	17.65
Rovimix (MI)	1.50	1.50	1.50	1.50
Fosfolípidos (MI)	1.00	1.00	1.00	1.00
Colesterol (MI)	0.5	0.5	0.5	0.5
Nature-DHA 17% (MI)	3.00	3.00	3.00	3.00
Benzoato de sodio (MI)	0.23	0.23	0.23	0.23
Cloruro de colina (MI)	0.09	0.09	0.09	0.09
BHT (MI)	0.01	0.01	0.01	0.01
Nanopartículas de PET	0.00	0.05	0.1	0.2
<b>TOTAL</b>	100	100	100	100

Antes de la preparación de cada dieta cada uno de los ingredientes se pesó por separado en balanza analítica (Sartorius).

**Dieta NanoPET 0 mg/g**

Primero, se agregaron los micronutrientes en el vaso de la licuadora, estos se agitaron durante 1 min y después se agregaron los macronutrientes sobre los micronutrientes para agitarse durante otro minuto. A esta dieta no se le agregó NanoPET porque va a ser el alimento control. Después de dos minutos de agitación se agregó la Maicena cocida, junto con la grenetina disuelta en agua tibia a la mezcla de los micro y macro nutrientes. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 1 min y al final, se agregó el sebo de res caliente a la masa de los ingredientes y se mezcló durante 2 min (Araújo et al., 2020).

**Dieta NanoPET 0.25 mg/g**

Se agregaron los micronutrientes en el vaso de la licuadora, estos se agitaron durante 1 min y después se agregaron los macronutrientes sobre los micronutrientes para agitarse durante otro minuto. A esta dieta no se le agregaron 50 mg de NanoPET. Después de dos minutos de agitación se agregó la Maicena cocida, junto con la grenetina disuelta en agua tibia a la mezcla de los micro y macro nutrientes. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 1 min y al final, se agregó el sebo de res caliente a la masa de los ingredientes y se mezcló durante 2 min (Araújo et al., 2020).

**Dieta NanoPET 0.5 mg/g**

Se agregaron los micronutrientes en el vaso de la licuadora, estos se agitaron durante 1 min y después se agregaron los macronutrientes sobre los micronutrientes para agitarse durante otro minuto. A esta dieta no se le agregaron 100 mg de NanoPET. Después de dos minutos de agitación se agregó la Maicena cocida, junto con la grenetina disuelta en agua tibia a la mezcla de los micro y macro nutrientes. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 1 min y al final, se agregó el sebo de res caliente a la masa de los ingredientes y se mezcló durante 2 min (Araújo et al., 2020).

**Dieta NanoPET 1 mg/g**

Se agregaron los micronutrientes en el vaso de la licuadora, estos se agitaron durante 1 min y después se agregaron los macronutrientes sobre los micronutrientes para agitarse durante otro minuto. A esta dieta no se le agregaron 200 mg de NanoPET. Después de dos minutos de agitación se agregó la Maicena cocida, junto con la grenetina disuelta en agua tibia a la mezcla de los micro y

macro nutrientes. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 1 min y al final, se agregó el sebo de res caliente a la masa de los ingredientes y se mezcló durante 2 min (Araújo et al., 2020).

La mezcla final de cada alimento se colocó en un vaso de precipitados y se cubrió con Parafilm para evitar que se secase. Después de cada vaso se tomó un muestra de alimento y se puso en una jeringa de 50 mL (sin aguja) para obtener hilos finos de alimento, obteniendo un diámetro final de 1.5-2.0 mm. Esto se realizó con todo el alimento preparado de cada vaso de precipitados que contenía las dietas. Las pastas resultantes (Figura 6) se secaron por cuarenta minutos antes de cortarse con el procesador de alimento (Waring). Después de obtener unos pellets de entre 4 y 5 mm de largo (Figura 7) se secaron a 60°C durante 24 h.



**Figura 6.** Cuerdas de alimento húmedo



**Figura 7.** Pellets de dieta de camarón

### 2.3 Cultivo de camarones en un sistema de recirculación de agua

El sistema de recirculación de agua (Figura 8) que se utilizó para el cultivo de los camarones (*L. vannamei*) se localiza en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Este sistema estuvo conformado por 12 cubetas, un reservorio de agua de 300 L con un biofiltro, una bomba de agua para mantener el agua circulando, un sistema de oxigenación y resistencias eléctricas para mantener una temperatura constante de 28°C, la cual es ideal para los organismos en el agua. Los cultivos se mantuvieron protegidos de la luz solar con la ayuda de películas de poliuretano

Cada cubeta tenía una capacidad de 40 L y una forma cilíndrica con una abertura en la parte superior que fue cubierta con una malla y en la parte inferior contaba con una abertura circular que se conectaba a un tubo para descargar en la tubería que llega al reservorio, de donde eventualmente sería bombeada de regreso a llenar las 12 cubetas. El agua y el oxígeno se suministran a cada cubeta por medio de mangueras que se introducían a través de la malla y descargaban en la cubeta.

El biofiltro es conformado por cristales porosos que permite que haya una regulación ambiental tanto de las bacterias heterótrofas como de las bacterias nitrificantes y sean proporcionales las cargas de nutrientes proporcionadas a las bacterias (Timmons et al., 2006).



**Figura 8.** Sistema de cubetas en el invernadero del IIO.

Antes de poner el sistema de recirculación de agua fue estrictamente necesario lavar todos los aditamentos del sistema, además de asegurarse que la bomba y las resistencias eléctricas funcionaran adecuadamente. Primero, se agregó agua en el reservorio, el cual contiene un soporte plástico para albergar a las bacterias nitrificantes del biofiltro (Figura 9). Después, se conectó la bomba y se abrieron las válvulas para que las cubetas comenzaran a llenarse. Se aseguró que no hubiera fugas en los tanques, válvulas, ni las mangueras que llenan los tanques. Se colocaron 3 resistencias eléctricas con una potencia de 300 W, cada una, dentro del reservorio y se colocaron a una temperatura de 28°C. Después de 24 h se revisó que no hubiera disminuido el nivel del agua en las cubetas y el reservorio por alguna fuga. Se tomó la temperatura, la salinidad, la oxigenación y los niveles de nitratos en el agua para poder proceder a colocar a los 24 camarones (*L. vannamei*).



**Figura 9.** Reservorio de agua del sistema de recirculación de cubetas con el biofiltro.

### **2.3.1 Calidad del agua**

El bioensayo se llevó a cabo entre los meses de marzo y abril y con el fin de monitorear la calidad del agua en el sistema de recirculación se midieron los siguientes parámetros:

- La temperatura del agua se midió diario entre las 9 y 10 am, en cada una de las 12 cubetas y en el tanque del reservorio con ayuda del oxímetro (YSI Pro 2030). Con este mismo dispositivo se midió la salinidad y el oxígeno disuelto en el agua de manera semanal.
- Para medir el pH de los tanques y el reservorio, se recolectaba una muestra de agua, de manera semanal y se analizaba con ayuda del potenciómetro (Thermo Scientific Orion 4 Star) en el laboratorio de nutrición del IIO.
- Las pruebas de nitritos ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) se realizaron con ayuda del kit de API, de manera semanal para conocer la relación de amoníaco en el agua del reservorio del sistema de recirculación en el sistema de cubetas.

## 2.4 Ensayo experimental

Se utilizaron 24 camarones blancos de la especie *Litopenaeus vannamei* provenientes de la empresa Aquapacífico, localizada en Mazatlán, Sinaloa. Se pesaron individualmente y se asignaron al azar 2 organismos por estanque. Dando un total de 6 camarones por tratamiento. Antes de ingresar cada camarón a su tanque de manera aleatoria se pesaron en una báscula (Ohaus). Se alimentaron, al 6% de su peso, tres veces al día, de lunes a domingo, durante 33 días. Los tratamientos con las distintas concentraciones de nanoplásticos (0, 0.25, 0.5 y 1 mg/g de NanoPET) se distribuyeron aleatoriamente quedando como se indica en la Figura 10. Los tanques 1, 4 y 7 fueron del tratamiento de 1 mg/g de NanoPET. Los tanques 2, 5 y 10 fueron del tratamiento de 0.5 mg/g de NanoPET. Los tanques 6, 9 y 11 fueron del tratamiento de 0.25 mg/g de NanoPET. Los tanques 3, 8 y 12 fueron del tratamiento control con 0 mg/g de NanoPET.



**Figura 10.** Distribución aleatoria de tratamientos. Los tanques amarillos (1,4 y 7) representan el tratamiento de 1 mg/g de NanoPET. Los tanques naranjas (2,5 y 10) son de 0.5 mg/g de NanoPET. Los tanques rosas (6,9 y 11) son de 0.25 mg/g de NanoPET. Los tanques azules (3,8 y 12) son de 0 mg/g de NanoPET.

## 2.5 Toma de muestras de los camarones blancos (*L. vannamei*)

El ensayo de alimentación duró 33 días y posteriormente se realizó el muestreo de los camarones y con el fin de encontrar alimento en los intestinos, se suministró la dosis matutina de alimento previo a su sacrificio.

Para la toma de muestras, los organismos se colectaron de dos en dos (por unidad experimental). Se llevaron con vida al laboratorio en un recipiente con un gel refrigerante para inducir la hipotermia. Esto se realizó siguiendo los protocolos establecidos en el Laboratorio de nutrición del (IIO) basados en la Ley Federal de Salud Animal y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. A uno de esos camarones se le extrajo la hemolinfa (Figura 11), con una jeringa con anticoagulante (Alsever modificado). Este camarón se pesó en la balanza analítica y se le extrajo el hepatopáncreas, el cual también fue pesado. Después se colocaron en una solución de formalina al 10% el músculo y la cabeza.

El segundo camarón colectado y que se encontraba en el recipiente, una vez que ha pasado por el choque térmico (hipotermia) se pesó y el hepatopáncreas se cortó por la mitad. Una mitad se colocó en un tubo Eppendorf con solución RNA $\text{later}^{\text{®}}$  para los análisis moleculares y la otra se colocó en un tubo Eppendorf con PBS. El músculo y la cabeza del camarón se colocaron en un frasco que había sido previamente llenado con solución de formalina al 10% que ya contenía al primer camarón.

Esto se realizó para los doce estanques. Los doce frascos con formalina fueron sellados y refrigerados a 4°C para evitar la liberación de vapores de formol y poder examinarse posteriormente. Los doce tubos con la muestra en solución de RNA $later^{\circ}$  se colocaron en el refrigerador a 4°C durante 24 h y posteriormente se colocaron a -80°C en espera de ser analizados. Los tubos con muestra en PBS se guardaron a 4°C hasta su análisis.



**Figura 11.** Toma de muestra de hemolinfa

## **2.6 Análisis bioquímicos**

### **2.6.1 Variables bioquímicas en hemolinfa**

Con el fin de conocer los posibles efectos que los nanoplásticos pudieran causar en la hemolinfa de los camarones blancos, la muestra de hemolinfa de cada uno de los camarones fue analizada siguiendo los protocolos de Grupo Mexlab para evaluar proteína total, glucosa, triglicéridos y colesterol. Las mediciones de hemolinfa fueron realizadas con el espectrofotómetro lector de placas Thermo Scientific Multiskan GO.

#### **2.6.1.1. Proteínas totales**

La concentración de proteína total se obtuvo siguiendo el protocolo de Valtek Proteína Total (Biuret) de Grupo Mexlab. El principio de la reacción de Biuret se basa en una técnica colorimétrica en la que una solución alcalina de sulfato de cobre entra en contacto con los enlaces peptídicos formando

un complejo de color azul-violeta que pudiera leerse a 540 nm de absorbancia en el espectrofotómetro.

#### **2.6.1.2. Glucosa**

La glucosa en la hemolinfa se determinó por medio del protocolo de Valtek bajo el principio en el que la glucosa reacciona con una mezcla de enzimas que contiene glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD). Primeramente, la enzima GOD oxida la glucosa en ácido glucónico, liberando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Mientras esta reacción sucede la enzima POD reacciona con el ácido p-hidroxibenzoico y 4-aminoantipirina. La absorbancia del compuesto resultante se lee a 505 nm.

#### **2.6.1.3. Triglicéridos**

La concentración de triglicéridos en la hemolinfa fue determinada con ayuda del protocolo de Valtek. El fundamento de esta reacción conste en la hidrólisis de los triglicéridos por parte de una lipasa específica que libera ácidos grasos y glicerol. El glicerol es fosforilado por la enzima gliceroquinasa y posteriormente, el glicerol-1-fosfato oxida a dihidroxiacetona fosfato por la enzima glicerol-fosfato oxidasa para generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Finalmente, en una reacción del tipo Trinder, el  $H_2O_2$  reacciona con la 4-aminoantipirina y el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfónico, produciendo un compuesto que absorbe a 520 nm.

#### **2.6.1.4. Colesterol**

El protocolo de Valtek para la detección de colesterol en la hemolinfa de los organismos se llevó a cabo gracias a la acción de la enzima colesterol ester hidrolasa. Esta libera el colesterol de los ésteres de colesterol y una segunda enzima, colesterol oxidasa, oxida el colesterol libre produciendo

peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reaccionando con la enzima peroxidasa. La solución resultante se lee a 505 nm.

## **2.6.2 Análisis bioquímico en hepatopáncreas**

Durante el muestreo de los 24 organismos se extrajeron 12 muestras de hepatopáncreas, es decir se extrajo el hepatopáncreas de uno de los camarones de cada estanque. Cada muestra fue pesada y cortada por la mitad, cada mitad de muestra se colocó en un tubo eppendorf con 1 mL de buffer de fosfato (PBS) y homogenizada. Las muestras fueron después centrifugadas a 10,000g durante 20 minutos a 4°C. Para preparar la medición de las muestras se preparó una dilución 1:10, agregando 100  $\mu$ L de sobrenadante más 900  $\mu$ L de PBS y se mezcló con ayuda de un vortex. Esto se realizó para cada una de las doce muestras. De cada solución preparada se midieron, los iones de nitritos y las especies reactivas de oxígeno en los hepatopáncreas.

### **2.6.2.1. Nitritos totales**

El contenido de nitritos ( $NO_2$ ) en el tejido de los hepatopáncreas se cuantificó con ayuda de la prueba de Griess. El reactivo de Griess Sigma Aldrich (modificado) está compuesto por diclorhidrato de naftiléniamida y sulfanilamida. Los nitritos presentes en la muestra reaccionaron con la sulfanilamida en medio ácido, la sal de diazono que se formó reaccionó con el diclorhidrato de naftiléniamida, dando como resultado la aparición de un color rosa en la muestra.

Es así que de cada muestra de la solución de hepatopáncreas descrita anteriormente se tomaron 100  $\mu$ L más 100  $\mu$ L del reactivo de Griess, esta acción se repitió tres veces para cada muestra. Se dejó incubar durante quince minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia de la placa a 540 nm.

### **2.6.2.2. Especies Reactivas de Oxígeno**

La detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Invitrogen. Con el fin de detectar las posibles especies reactivas de oxígeno presentes en el homogenizado del hepatopáncreas, se procedió a tomar 100  $\mu$ L de cada una de las soluciones homogenizadas y centrifugadas y se les agregó 100  $\mu$ L de diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína (HDCFDA), por triplicado para las 12 muestras. Se incubó a 30°C durante 45 minutos, y se hizo una lectura de fluorescencia por medio de un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent Technologies).

## **2.7 Extracción ADN genómico**

### **2.7.1 Purificación de ARN**

Para la extracción de ARN de la muestra de tejido de hepatopáncreas se siguió el protocolo de PureLink RNA Mini Kit de Life Technologies. Se tomó el apartado de purificación del ARN de tejidos animales. Para comenzar se preparó el buffer de lisis celular y se agregaron 600  $\mu$ L al tubo donde se realizó la homogenización del tejido con un pistilo, después se enjuagó con 600  $\mu$ L de etanol. Se colocó el cartucho de centrifugación, en el que se vertió la muestra y se centrifugó a 12,000g durante 30 seg.

Se realizó un primer lavado de la muestra con el buffer (WBI) se centrifugó, se desechó el remanente y se colocó en un nuevo tubo recolector. Se agregaron 80  $\mu$ L de ADNasa, después de 15 min. de reposo se volvió a lavar con el WBI y se centrifugó de nuevo. Se lavó la muestra con el buffer de lavado 2 (WBII), donde también se desechó la muestra centrifugada y se colocó el cartucho de centrifugación en un nuevo tubo recolector. Se hizo un último lavado con WBII y se centrifugaron las muestras durante 1 min. a 12,000g. Por último, la muestra se colocó en el termociclador a 65°C durante 5 min para evaporar los restos de etanol que quedaran. Este procedimiento se realizó para las 12 muestras de tejido que se analizaron. La concentración y pureza (con respecto al contenido de proteínas y solventes) del ARN extraído de cada muestra, se evaluó por medio de espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermofisher®).

### 2.7.2 Cuantificación de la expresión genética

Con la intención de extraer ADN de las muestras y evaluar la expresión genética en los hepatopáncreas de los genes *SOD*, *CAT*, *GPx* y *GST*. Se obtuvo cDNA de las muestras siguiendo el protocolo High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de Thermo Fisher.

El ARN total de las muestras (500 ng) se transcribió inversamente en una reacción de 20  $\mu$ L en un termociclador de pozo Verity 96 (Applied Biosystems). Para obtener los 20  $\mu$ L finales de volumen se preparará con 10  $\mu$ L de la muestra y los 10  $\mu$ L de la mezcla maestra (Tabla 4). Los ciclos de transcripción se llevan a cabo de acuerdo a la Tabla 5. Se realizaron reacciones de qRT-PCR con 1ng de ADNc y se agregaron los oligonucleótidos Fwd y Rv sequence (Tabla 6) (200 nM cada uno) y SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en 10  $\mu$ L, en MicroAmp<sup>®</sup> placas de reacción ópticas rápidas de 96 pozos (Applied Biosystems) cubiertas con MicroAmp<sup>®</sup> película adhesiva óptica (Applied Biosystems).

**Tabla 4.** Mezcla maestra

Componente	Volumen
<b>10X RT Buffer</b>	2.0 $\mu$ L
<b>Mezcla dNTP 25X (100 mM)</b>	0,8 $\mu$ L
<b>10X RT Primeros aleatorios</b>	2.0 $\mu$ L
<b>MultiScribe™ Transcripción inversa</b>	1.0 $\mu$ L
<b>Inhibidor de la RNasa</b>	—
<b>H<sub>2</sub>O sin nucleasa</b>	4.2 $\mu$ L
<b>Total por reacción</b>	10.0 $\mu$ L

La cuantificación relativa de genes se calculó mediante el método  $\Delta\Delta$ CT (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando un umbral automatizado y una línea de base de marcha para determinar los valores de TC. Las condiciones de PCR fueron: una etapa inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa durante 10 min a 95°C; 40 ciclos de desnaturalización para 15 s a 95°C, recocido y extensión para 45 s a 60°C; y una curva de fusión final de 60 °C a 95 °C durante 20 minutos para verificar si hay artefactos de dímero de imprimación. La optimización de las condiciones de qRT-PCR se realizó en la temperatura de recocido de cebadores (60 °C), la concentración de cebadores (200 nM) y la concentración de cadenas (cinco series de dilución 1:10 de 10 ng a 100 fg de ARN de

entrada).  $\beta$ -actina (*actb*) se utilizó como gen de referencia interno (GenBank acc. no AF300705). Los números de acceso de GenBank para los genes estudiados son: AB108065 para *SOD*, AY518322 para *CAT*, AY973252.2 para *GPx*, y XM\_027351980 para *GST*.

**Tabla 5.** Ciclos en el termociclador.

Configuración	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Temp.	25°C	37°C	85°C	4°C
Hora	10 minutos	120 minutos	5 minutos	Reposo

**Tabla 6.** Se indican los pares de oligonucleótidos utilizados para las secuencias de cebadores q-PCR, los tamaños de los amplicones en pares de bases (bp), las eficiencias de reacción (E) y los coeficientes de determinación de Pearson (R2).

Gen (símbolo)	Fwd secuencias (5' - 3')	Rv secuencia (5' - 3')	Tamaño (bp)	E	R2
<i>CAT</i>	GCC CGT ACA AGG AAC TAC CA	TGC CCT ACC TTT ATG AGT AGC C	231	0.90	0.99
<i>SOD</i>	CCA GGG CTT CCA TTA ACA AC	ATG TTG GGT CCA GAA GAT GG	154	0.91	1.00
<i>GST</i>	TGC GAA TAG CCA ACA CTC TG	TGC TCT GCG TTA TCT TCA CG	245	1.03	0.98
<i>GPX</i>	TTT TTC CGT GCA AAA AGG AC	TAA TAC GCG ATG CCC CTA AC	239	0.94	1.00

## 2.8 Análisis estadístico

Los parámetros biométricos, (peso y longitud) junto con las pruebas bioquímicas de la hemolinfa y el hepatopáncreas (n=6) fueron evaluados con una ANOVA de una vía para determinar la presencia de diferencias entre poblaciones, mientras que, para aquellos parámetros que presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se aplicó una prueba *a posteriori* de Dunnet.

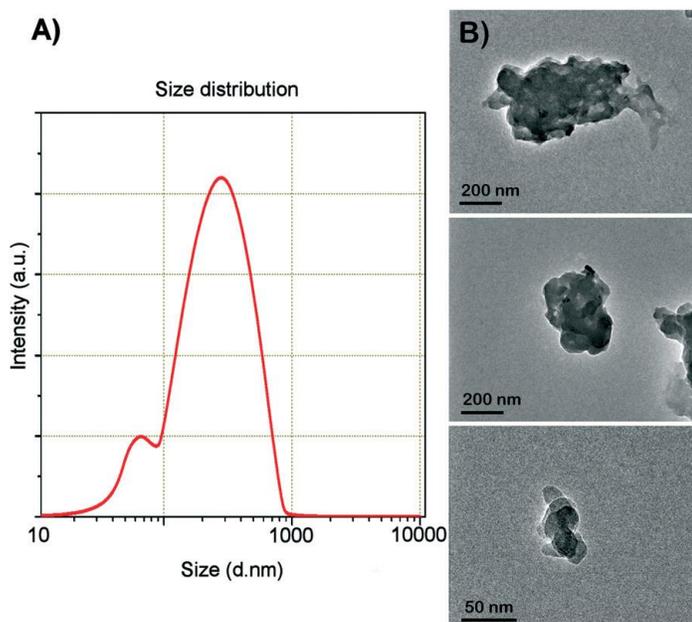
En el caso de los análisis de expresión genética también se evaluó con una ANOVA de una vía para determinar la presencia de diferencias entre poblaciones y para aquellos parámetros que presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se aplicó una prueba *a posteriori* de Tukey. Todos los datos fueron procesados con el software Graph Prism 8.0.2.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Síntesis de nanopartículas de tereftalato de poliestireno

Está documentado que durante la síntesis de NanoPET de acuerdo al protocolo de Rodríguez-Hernández, et al. (2019). El tamaño de partícula que se obtuvo fue de entre 50 y 200 nm (Figura 12). Lo cual se pudo corroborar tanto por dispersión dinámica de luz (DLS) como por microscopía de transmisión electrónica (TEM).



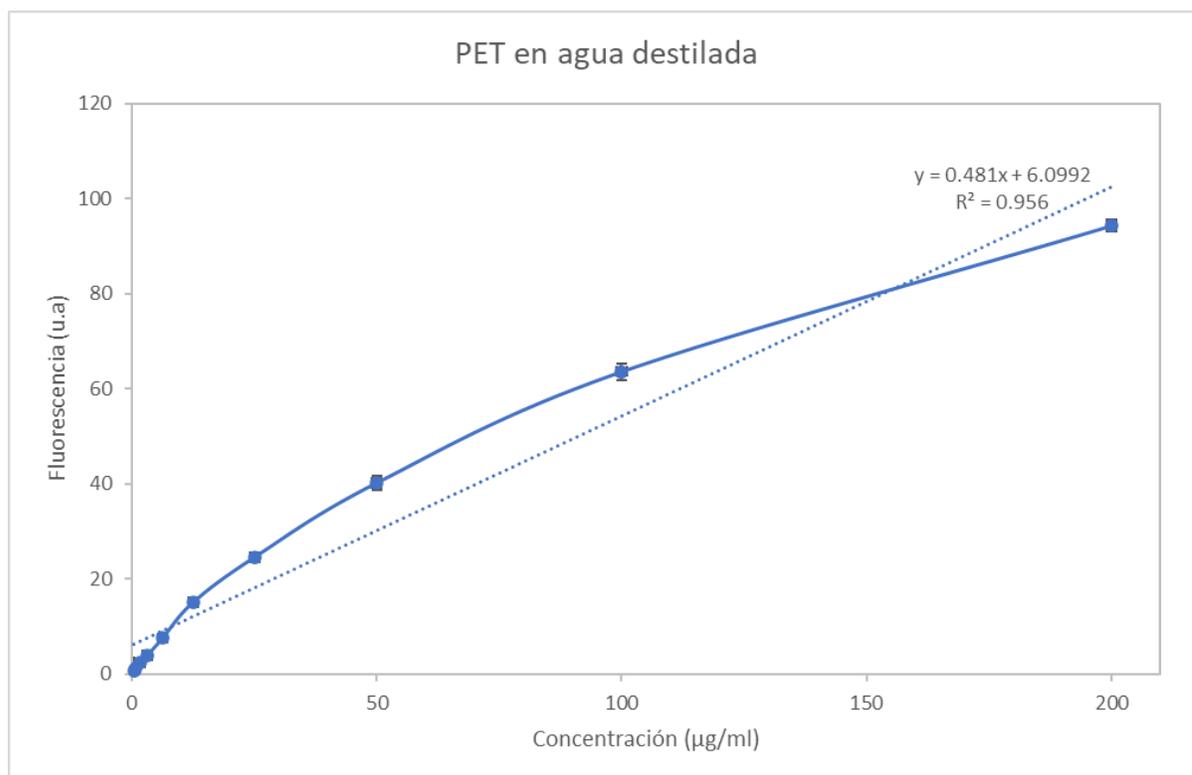
**Figura 12.** A) Diámetro determinado por dispersión dinámica de luz y B) Micrografía de TEM que muestra el tamaño de los agregados obtenidos durante la síntesis. Tomado de (Rodríguez-Hernández et al., 2019).

También fue indispensable medir la fluorescencia de las nanopartículas de PET al ser teñidas con Rojo Nilo. Pues era imperioso confirmar la presencia de las nanopartículas plásticas de PET en el alimento. Las nanopartículas de PET teñidas con el Rojo Nilo presentaron un máximo de excitación a 558 nm y una emisión máxima a 637 nm diluidas en agua destilada (Figura 13). Inicialmente se disolvió 1 mg de nanopartículas de PET en 5 mL de agua destilada, obteniendo una concentración de 0.2 mg/mL y con la cual se realizaron diluciones hasta conocer el límite inferior de detección de la fluorescencia. Los

resultados representados corresponden al valor de la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar (Tabla 7).

**Tabla 7.** Emisión de fluorescencia de NanoPET disuelto en agua.

Excitación/Emisión (558/637 nm)			
$\mu\text{g/mL}$	media		DS
200	94.29	±	1.3
100	63.59	±	1.7
50	40.18	±	1.5
25	24.50	±	0.3
12.5	15.03	±	0.3
6.25	7.48	±	0.3
3.125	3.84	±	0.3
1.52	2.34	±	0.2
0.78	1.21	±	0.3
0.391	0.73	±	0.3



**Figura 13.** Fluorescencia detectada en nanopartículas plásticas de PET disueltas en agua destilada.

Con el fin de obtener una mayor extracción de Rojo Nilo, se repitió el protocolo de disolución utilizando etanol (70%) como solvente.

### **3.2 Preparación de dieta con nanoplásticos para camarón**

Se prepararon 4 alimentos para los camarones blancos, cada uno con una concentración distinta de NanoPET: 0 mg/g, 0.25 mg/g, 0.5 mg/g y 1mg/g. Con el fin de conocer la intensidad de fluorescencia que se podía observar en el alimento fue necesario realizar mediciones con la dieta control y la dieta de 1 mg/g, aparte de que se hicieron mediciones en dos rangos de emisión y excitación: 515/585 nm y 558/636 nm

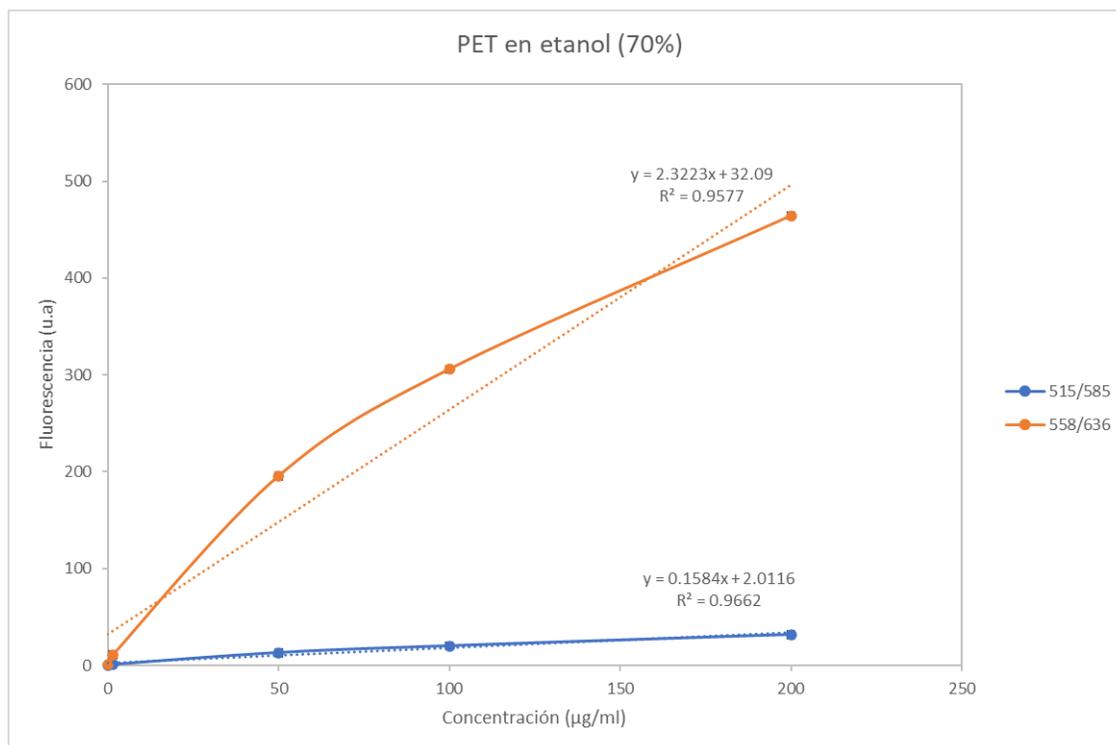
La razón por la que se manejaron dos rangos de emisión/excitación es porque el primero: 636/585 nm, muestra el rango en el que las nanopartículas de PET teñidas con Rojo Nilo son detectadas por el espectrofotómetro de fluorescencia (Agilent Technologies). El segundo rango: 558/636 nm, es en el cual el alimento que contiene nanopartículas plásticas de PET mostró su mayor índice de actividad fluorescente.

La Figura 14 refleja como el etanol (70%) es capaz de extraer el Rojo Nilo de los nanopartículas permitiendo que su actividad fluorescente sea detectada por el espectrofluorímetro. Los valores de fluorescencia en la Tabla 8 para el rango 558/636 nm permitió estimar la fluorescencia en el alimento con NanoPET en comparación con el alimento control

Primero, para conocer el valor real de fluorescencia en el alimento se midió 1 g de alimento con 0 mg/g de NanoPET como control, disolviéndose este en 5 mL de agua destilada obteniendo una concentración final de 200 µg/mL de alimento. Esta dilución se continuó en una proporción 1:2 en agua destilada hasta obtener el límite inferior de detección de fluorescencia. Se realizó el mismo procedimiento con etanol al 70%.

**Tabla 8.** Emisión de fluorescencia de NanoPET disuelto en etanol (70%).

$\mu\text{g/mL}$	515/585 nm			558/636 nm		
	media		DS	media		DS
<b>200</b>	31.80	$\pm$	0.6	464.17	$\pm$	2.3
<b>100</b>	20.12	$\pm$	0.3	305.83	$\pm$	0.7
<b>50</b>	13.03	$\pm$	0.2	195.49	$\pm$	1.8
<b>1.5</b>	0.76	$\pm$	0.1	10.75	$\pm$	0.7
<b>0.05</b>	0.05	$\pm$	0.1	0.61	$\pm$	0.1

**Figura 14.** Fluorescencia detectada en nanopartículas plásticas de PET disueltas en etanol.

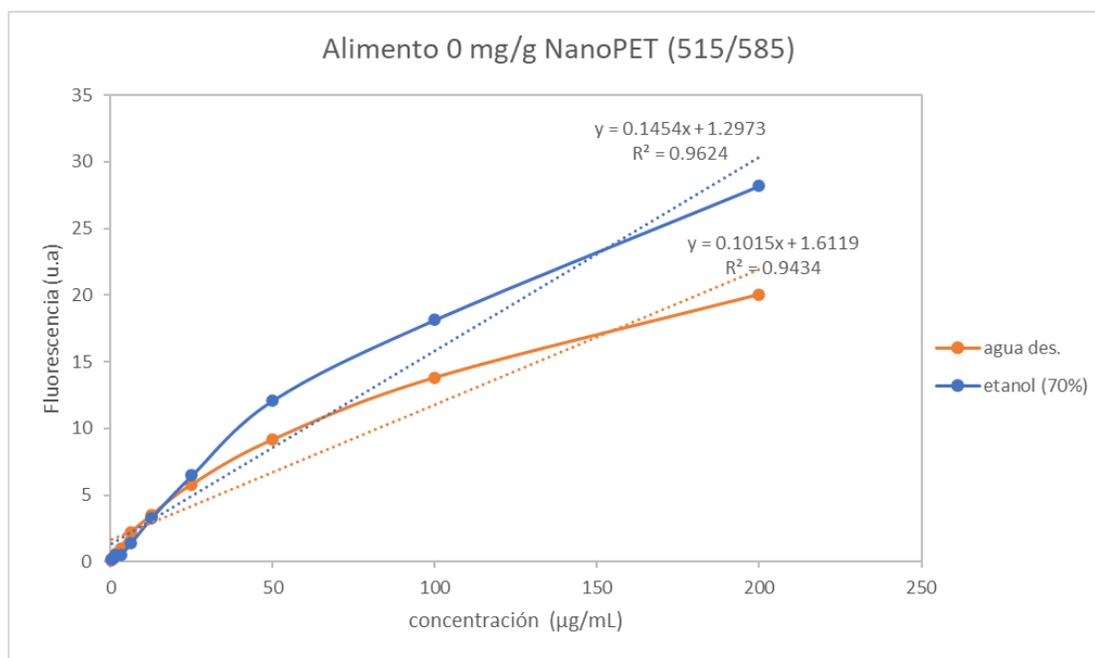
### 3.2.1 Alimento con concentración 0 mg/g de NanoPET

La Figura 15 y 16 muestran la tendencia de la actividad fluorescente del alimento con 0 mg/g de NanoPET. El propósito de disolver el alimento era el de encontrar el solvente que funcionara mejor para la extracción de Rojo Nilo de las nanopartículas de PET. La Tabla 9 engloba los valores obtenidos en el rango 515/585 nm y es el etanol (70%) el que muestra el mayor valor de fluorescencia, sin embargo, ese alimento no contenía NanoPET, lo que sugiere que el solvente extrae algún componente que es capaz de emitir una

respuesta en el mismo rango en el que emite el NanoPET. Lo que complementa que en la Tabla 10 el valor obtenido para el etanol fuera bajo en fluorescencia. El etanol (70%) muestra una diferencia significativamente mayor en la concentración de 200, 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando que funciona mejor que el agua para la extracción del Rojo Nilo.

**Tabla 9.** Evaluación de fluorescencia del alimento 0mg/g de NanoPET, con excitación a 515 nm y emisión a 585 nm.

$\mu\text{g/mL}$	Agua destilada			Etanol (70%)		
	media		DS	media		DS
<b>200.00</b>	20.05	±	0.1	28.20	±	2.1
<b>100.00</b>	13.82	±	0.5	18.16	±	0.3
<b>50.00</b>	9.16	±	0.1	12.11	±	0.4
<b>25.00</b>	5.80	±	0.1	6.47	±	0.2
<b>12.50</b>	3.49	±	0.0	3.25	±	0.2
<b>6.25</b>	2.19	±	0.1	1.40	±	0.1
<b>3.12</b>	1.04	±	0.1	0.55	±	0.1
<b>1.52</b>	0.63	±	0.0	0.47	±	0.1
<b>0.78</b>	0.35	±	0.0	0.29	±	0.0
<b>0.39</b>	0.14	±	0.1	0.19	±	0.1

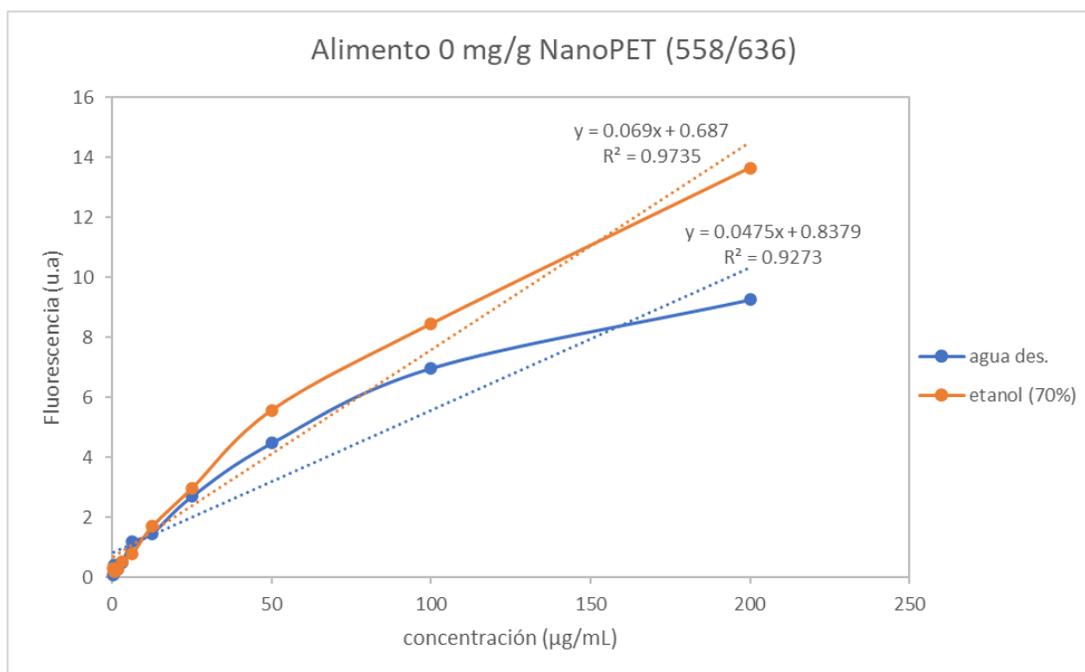


**Figura 15.** Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 0 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol (70%) medida en el rango de 515/585 nm. Cada solvente presenta su propia ecuación de la recta.

El alimento con 1 mg/g de concentración de NanoPET se tomó como límite máximo de espectro de fluorescencia de los 4 alimentos preparados. Partiendo de la Tabla 3 que señala que el alimento de concentración 1mg/g contiene 1 mg de NanoPET por cada gramo de dieta. Se tomó 1 g de alimento y se disolvió en 5 mL de agua destilada obteniendo una concentración final de 200 µg/mL. Esta dilución se continuó en una proporción 1:2 en agua destilada hasta obtener el límite inferior de detección de fluorescencia. Se realizó el mismo procedimiento con etanol al 70% (Tabla 10).

**Tabla 10.** Evaluación de fluorescencia del alimento alimento 0mg/g de NanoPET, con excitación a 558 nm y emisión a 636 nm.

µg/mL	Agua destilada			Etanol (70%)		
	media	DS		media	DS	
<b>200.00</b>	9.26	± 0.2		13.65	± 0.4	
<b>100.00</b>	6.97	± 0.4		8.45	± 0.2	
<b>50.00</b>	4.48	± 0.2		5.58	± 0.3	
<b>25.00</b>	2.71	± 0.1		2.98	± 0.3	
<b>12.50</b>	1.47	± 0.3		1.70	± 0.4	
<b>6.25</b>	1.19	± 0.2		0.79	± 0.2	
<b>3.12</b>	0.51	± 0.3		0.53	± 0.1	
<b>1.52</b>	0.26	± 0.2		0.26	± 0.2	
<b>0.78</b>	0.44	± 0.1		0.22	± 0.2	
<b>0.39</b>	0.07	± 0.1		0.30	± 0.1	



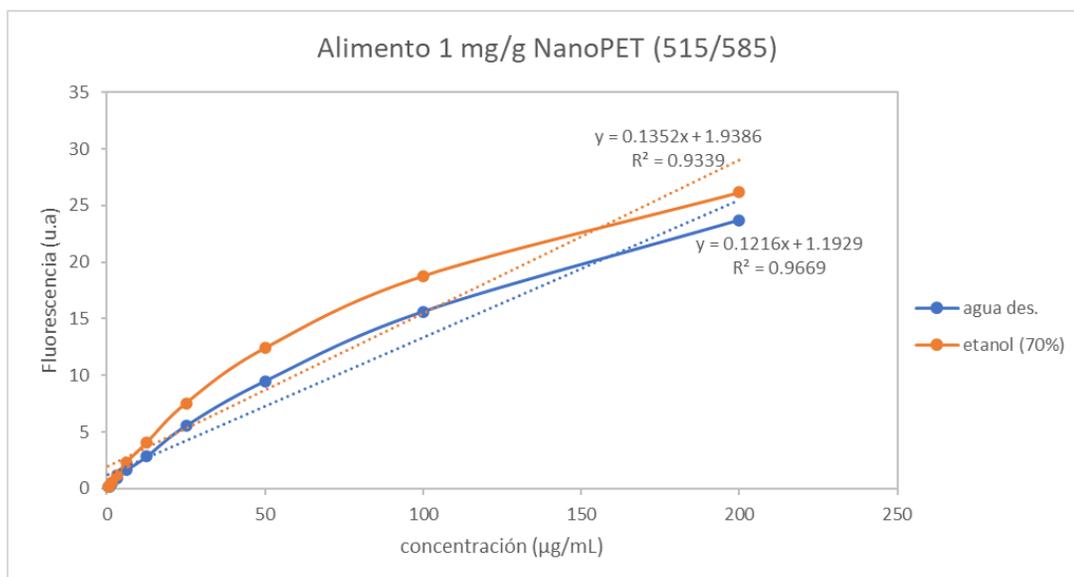
**Figura 16.** Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 0 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol medida en el rango de 558/636 nm. Cada solvente presenta su propia ecuación de la recta.

### 3.2.2. Alimento con concentración 1 mg/g de NanoPET

La Figura 17 muestra la respuesta de la actividad fluorescente del alimento con 1 mg/g de NanoPET en el rango 515/585 nm y la extracción con etanol (70%) es significativamente mayor en comparación con el agua en las diluciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g/mL}$ . En la Tabla 11 muestra valores significativamente mayores de fluorescencia extraídos con etanol (70%), haciendo alusión a la presencia de un elemento con fluorescencia, además de las nanopartículas de PET en el alimento.

**Tabla 11.** Evaluación de fluorescencia del alimento con 1 mg/g de NanoPET con excitación a 515 nm y emisión a 585 nm.

$\mu\text{g/mL}$	Agua destilada		Etanol (70%)	
	media	DS	media	DS
200.00	23.69	$\pm$ 0.1	26.15	$\pm$ 0.5
100.00	15.62	$\pm$ 0.1	18.77	$\pm$ 0.6
50.00	9.49	$\pm$ 0.1	12.41	$\pm$ 0.2
25.00	5.55	$\pm$ 0.3	7.53	$\pm$ 0.3
12.50	2.82	$\pm$ 0.3	4.03	$\pm$ 0.1
6.25	1.65	$\pm$ 0.0	2.33	$\pm$ 0.1
3.12	0.87	$\pm$ 0.1	1.19	$\pm$ 0.2
1.52	0.45	$\pm$ 0.2	0.52	$\pm$ 0.1
0.78	0.19	$\pm$ 0.1	0.28	$\pm$ 0.1
0.39	0.19	$\pm$ 0.1	0.19	$\pm$ 0.1

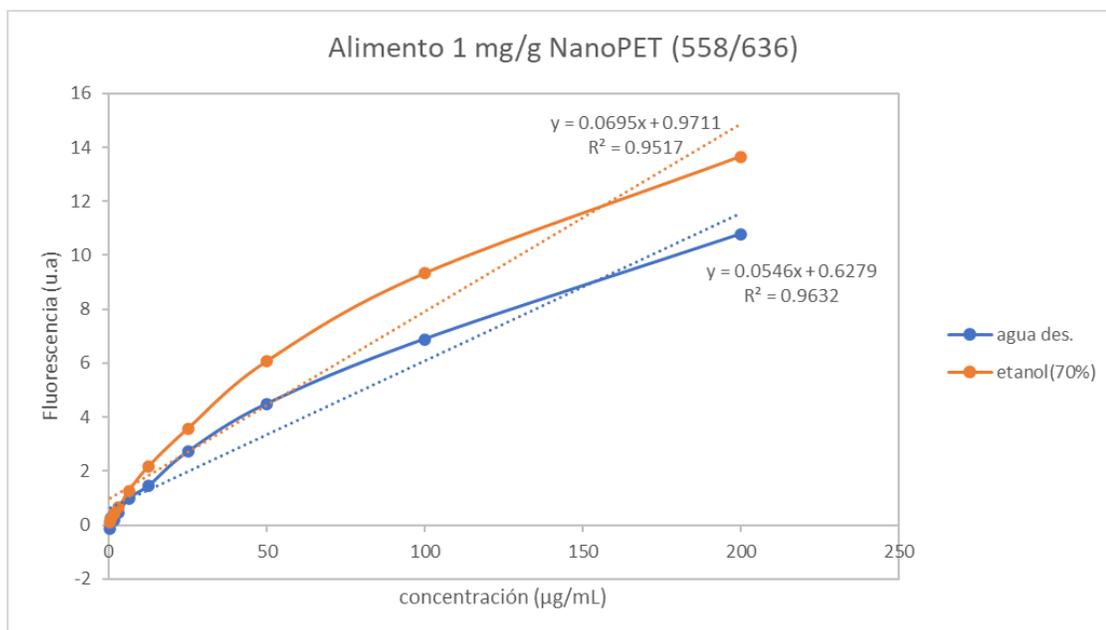


**Figura 17.** Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 1 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol medida en el rango de 515/585 nm. Cada solvente presenta su propia ecuación de la recta.

La Figura 18 analiza la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) que el etanol tiene al extraer mejor el Rojo Nilo del alimento, sin embargo, no fue posible determinar actividad fluorescente similar a la detectada en la Tabla 8. Se observó que una vez que las nanopartículas de PET se integraron en el alimento no mostraron fluorescencia tan alta como cuando se analizaron las nanopartículas de PET sin alimento.

**Tabla 12.** Evaluación de fluorescencia del alimento con 1 mg/g NanoPET, con excitación a 558 nm y emisión a 636 nm.

$\mu\text{g/mL}$	Agua destilada			Etanol (70%)		
	media		DS	media		DS
<b>200.00</b>	10.78	$\pm$	0.6	13.66	$\pm$	0.1
<b>100.00</b>	6.89	$\pm$	0.3	9.33	$\pm$	0.2
<b>50.00</b>	4.49	$\pm$	0.2	6.08	$\pm$	0.3
<b>25.00</b>	2.72	$\pm$	0.3	3.58	$\pm$	0.3
<b>12.50</b>	1.46	$\pm$	0.2	2.17	$\pm$	0.1
<b>6.25</b>	0.99	$\pm$	0.2	1.27	$\pm$	0.2
<b>3.12</b>	0.46	$\pm$	0.1	0.65	$\pm$	0.1
<b>1.52</b>	0.17	$\pm$	0.2	0.42	$\pm$	0.3
<b>0.78</b>	0.27	$\pm$	0.1	0.22	$\pm$	0.3
<b>0.39</b>	-0.13	$\pm$	0.1	0.12	$\pm$	0.2



**Figura 18.** Valores de fluorescencia de la dilución de alimento de 1 mg/g de NanoPET en agua destilada y etanol medida en el rango de 558/636 nm. Cada solvente presenta su propia ecuación de la recta.

### 3.3 Ensayo preliminar

Con el fin de establecer las condiciones experimentales del bioensayo y poder delimitar las condiciones apropiadas se realizó un ensayo preliminar. El ensayo comenzó con la preparación de dieta para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con nanoplasticos de PET en solución. Durante dos semanas se alimentaron camarones para poder extraerles el hepatopáncreas, intestinos y heces con el fin de detectar la presencia de nanopartículas de PET teñidas con Rojo Nilo. Se buscó fluorescencia en las muestras de los organismos, sin embargo, no fue posible determinar las diferencias entre los organismos expuestos a NanoPET con Rojo Nilo y los que no fueron expuestos.

### 3.4 Calidad de agua

Durante el desarrollo del bioensayo fue necesario cuidar de los parámetros fisicoquímicos que permiten que las condiciones marinas sean las adecuadas para el desarrollo de los organismos (*L. vannamei*). Durante los 33 días del experimento se cuidaron los siguientes parámetros medibles del agua del sistema de recirculación de cubetas y la frecuencia con la que se midieron:

- Temperatura (diario)
- Nitritos del agua (semanalmente)
- Salinidad (semanalmente)
- pH (semanalmente)
- Oxígeno disuelto (semanalmente)

La temperatura del agua se midió diario entre las 9 y 10 am, en cada una de las 12 cubetas y en el tanque del reservorio con ayuda del oxímetro (YSI Pro 2030). Con este mismo dispositivo se midió la salinidad y el oxígeno disuelto en el agua de manera semanal.

Para medir el pH de los tanques y el reservorio, se recolectaba una muestra de agua, de manera semanal y se analizaba con ayuda del potenciómetro (Thermo Scientific Orion 4 Star) en el laboratorio de nutrición del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO).

Las pruebas de nitritos ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) se realizaron con ayuda del kit de API, de manera semanal para conocer la relación de amoníaco en el agua del reservorio del sistema de recirculación en el sistema de cubetas.

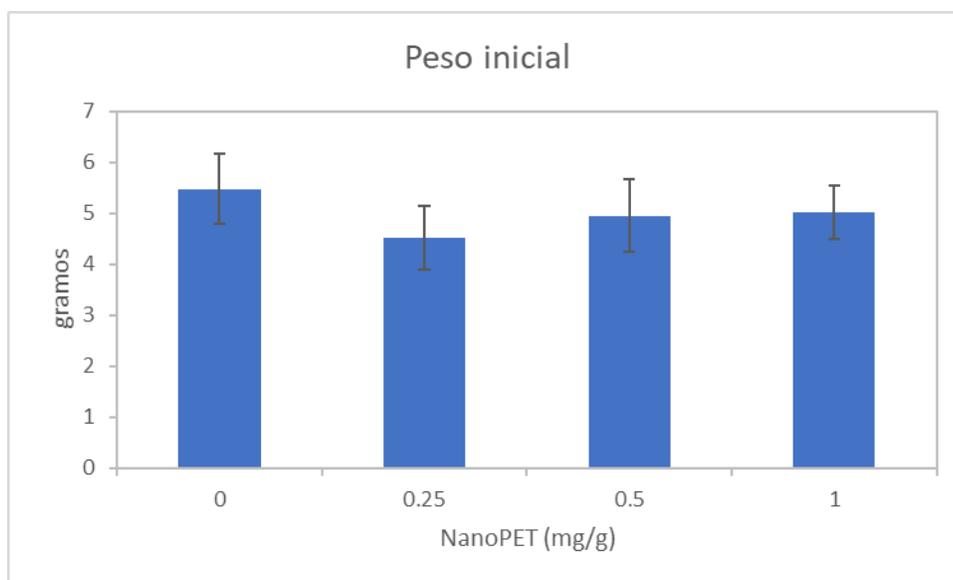
En la Tabla 13 se resumen los valores de los parámetros que se mantuvieron en los cultivos con las condiciones que permitieran un buen desarrollo de los camarones. De acuerdo con Brock y Main, (1994) los valores óptimos de supervivencia del camarón blanco son: oxígeno disuelto de 4 a 10 mg/L, pH de 8.1 a 9, temperatura de 23 a 30°C y salinidad de 15 a 35 ppt.

**Tabla 13.** Parámetros de calidad de agua del bioensayo.

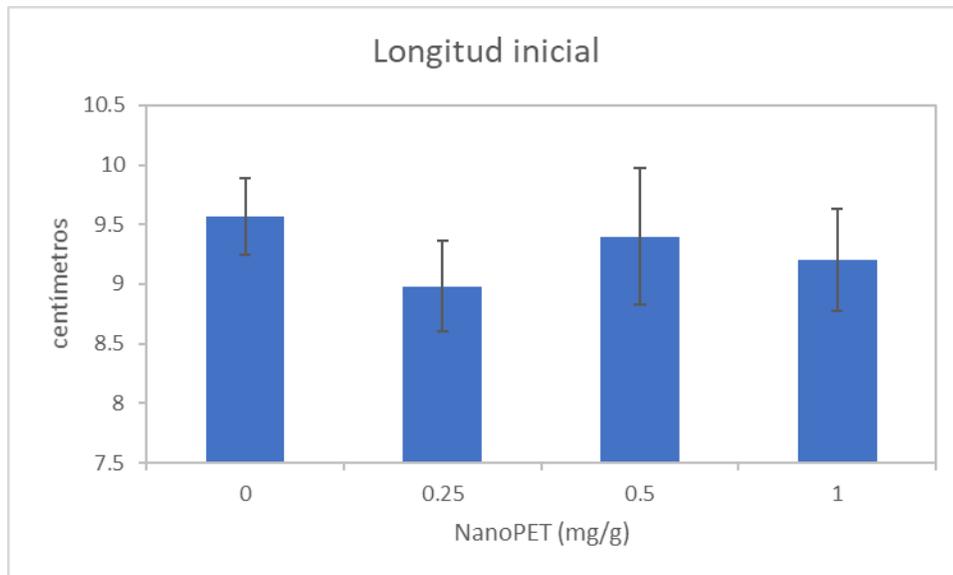
<b>NanoPET (mg/g)</b>	<b>0</b>		<b>0.25</b>		<b>0.5</b>		<b>1</b>	
<b>Temperatura (°C)</b>	27.63	±0.8	27.63	±0.8	27.63	±0.8	27.63	±0.80
<b>Nitritos (mg/L)</b>	00.25	-	0.25	-	0.25	-	0.25	-
<b>Salinidad (ppt)</b>	34.10	±0.3	34.50	±0.6	34.90	±0	35.60	±0.01
<b>pH</b>	07.80	±0.2	8.00	±0.2	8.00	±0.2	8.10	±0.20
<b>Oxígeno disuelto</b>	05.20		5.40		5.50		5.00	

### 3.5 Ensayo experimental

Conocer las medidas de los organismos es vital pues son un indicador de los cambios que hayan mostrado los organismos a lo largo del bioensayo. Al inicio del ensayo se pesó cada uno de los 24 camarones de manera individual y también se midió su longitud tomando como inicio de la medición el rostro y el punto final de medición la punta del urópodo. Los datos de medición que se obtuvieron al inicio del experimento se muestran en la Figura 19 y Figura 20 y no muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se deduce que los 24 organismos se encontraban en condiciones similares de peso y longitud antes de comenzar el ensayo. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA a los datos de peso inicial y también a los de longitud inicial. Ninguno de los dos análisis mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).



**Figura 19.** Los resultados representan el promedio del peso inicial de los organismos de cada tratamiento de NanoPET. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde ningún tratamiento mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).



**Figura 20.** Los resultados representan el promedio del longitud inicial de los organismos de cada tratamiento de NanoPET. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde ningún tratamiento mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

### 3.6 Toma de muestras de los camarones blancos (*L. vannamei*)

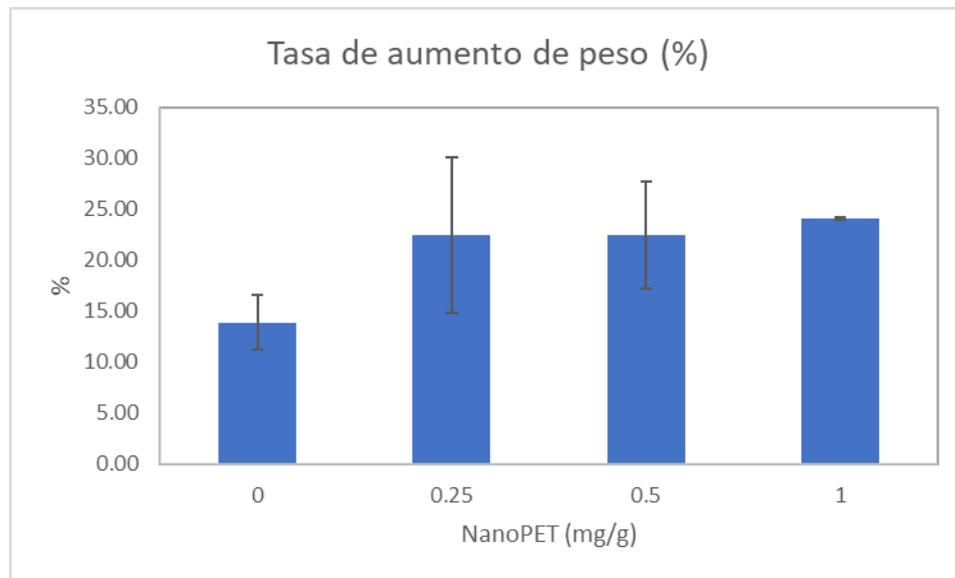
En la Tabla 14 se observa la compilación de los datos después de 33 días de experimentación. La tasa de supervivencia para el tratamiento control, 0.25 y 0.5 mg/g de NanoPET fue de 100%, sin embargo, la tasa de mortalidad para el tratamiento de la dieta de 1 mg/g de NanoPET fue de 83.33%. Durante el muestreo se registraron los pesos y longitudes finales de los organismos y poder así calcular la tasa de aumento de peso y la tasa de crecimiento. La tasa de aumento de peso y de crecimiento representan el porcentaje del peso y longitud ganado, respectivamente, después de que los camarones blancos del Pacífico (*L. vannamei*) fueron expuestos a diferentes concentraciones de NanoPET (0, 0.25, 0.5, 1 mg/g) durante las 4 semanas del bioensayo.

**Tabla 14.** Tasas de aumento de peso y longitud de los camarones al finalizar el bioensayo.

NanoPET (mg/g)	0		0.25		0.5		1	
<b>Peso final (g)</b>	5.60	±0.18	5.50	±0.49	6.08	±1.13	5.57	±0.68
<b>Tasa de aumento de peso (%)</b>	4.11	±10.41	22.48	±7.64	22.48	±5.28	10.05	±21.70
<b>Longitud media final del cuerpo (mm)</b>	9.77	±0.38	9.83	±0.33	9.78	±0.70	9.73	±0.53
<b>Tasa de crecimiento (%)</b>	2.63	±2.78	9.46	±4.85	4.08	±1.34	5.23	±9.24
<b>Porcentaje de supervivencia (%)</b>	100	-	100	-	100	-	83.33	-

La Figura 21 representa el aumento de peso ocurrido en los camarones (*L. vannamei*). El porcentaje de aumento de peso se obtuvo como la diferencia del peso final menos el peso inicial, o sea el peso ganado y se dividió entre el peso inicial. Se aplicó una ANOVA de una vía a la tasa de aumento de peso, sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de supervivencia se calculó con la ecuación (1):

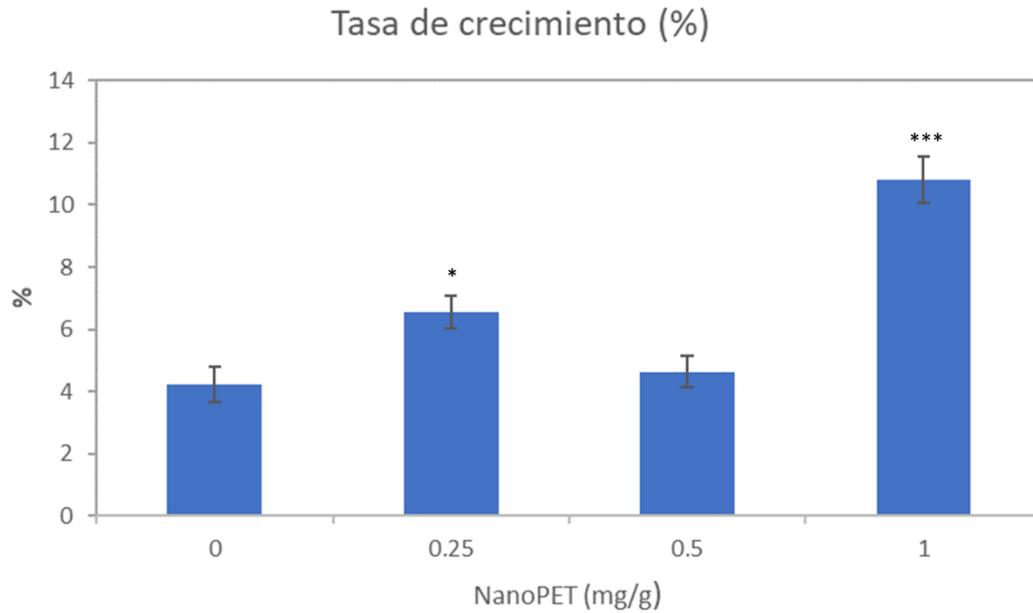
$$\% = \left[ 100 * \frac{\text{número final de organismos}}{\text{número inicial de organismos}} \right] \quad (1)$$



**Figura 21.** Los resultados representan el promedio del porcentaje del aumento de peso de los organismos de cada tratamiento de NanoPET. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde ningún tratamiento mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

La Figura 22 representa el aumento en el largo de los camarones (*L. vannamei*) ocurrido en los organismos. El porcentaje de aumento de longitud se obtuvo como la diferencia de la longitud final menos la inicial dividida entre el peso inicial, tomando como inicio la longitud inicial de los organismos al momento de iniciar el bioensayo e incluso antes de ser alimentados por primera vez con los alimentos con NanoPET. Se aplicó una ANOVA de una vía con los valores de la tasa de aumento de longitud, donde se encontraron los valores mayores en la concentración de 1 mg/g de NanoPET ( $p < 0.001$ ) y que fueron seguidos de lo encontrado con 0.25 mg/g de NanoPET ( $p < 0.05$ ), mientras que para las concentraciones de 0.5 mg/g de NanoPET y el tratamiento control no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Debido a que existen poca diferencia en los valores de la tasa de crecimiento evaluada en los camarones alimentados con las distintas dosis de NanoPET, es notable encontrar que cuando los organismos se alimentaron con la dieta 0.25 mg/g y 1 mg/g de NanoPET presentaron mejores crecimientos. Es importante tomar con cautela la interpretación de la concentración de las nanopartículas respecto a la ganancia en peso del camarón que fueron obtenidos.



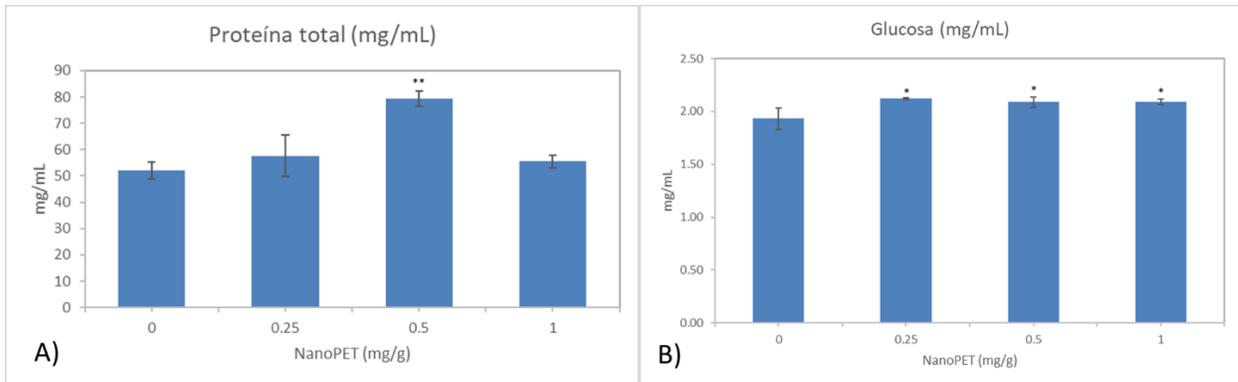
**Figura 22.** Los resultados representan el promedio del porcentaje de ganancia de longitud de los organismos de cada tratamiento de NanoPET. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde la significancia estadística representa \*( $p < 0.05$ ) y \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

### 3.7 Variables químicas en hemolinfa

Fue importante considerar para el estudio de los camarones blancos obtener el perfil de hemolinfa de los organismos con el fin de evaluar variaciones que pudieran reflejarse en la hemolinfa. Las variables químicas que fueron evaluadas en la hemolinfa de los camarones blancos fueron: proteína total, glucosa, triglicéridos y colesterol. Los 4 parámetros fueron evaluados comparando el grupo control con los grupos expuestos a NanoPET.

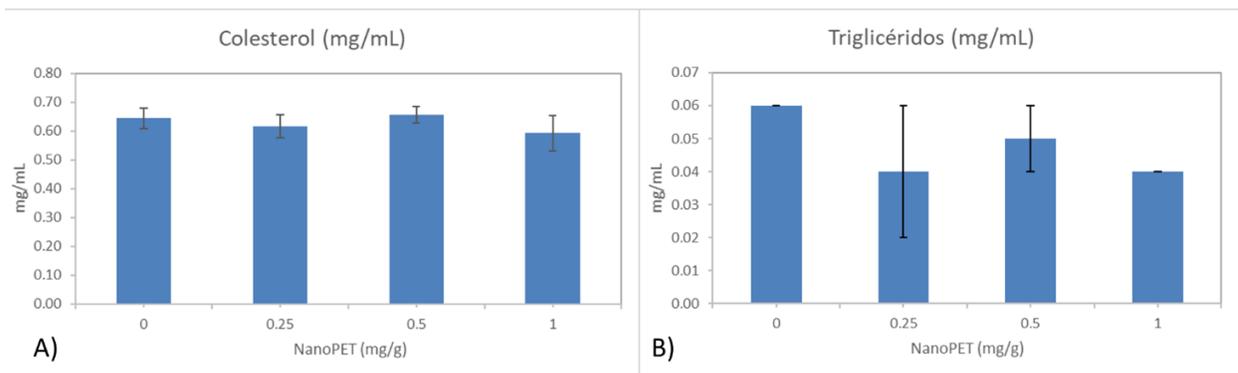
La Figura 23 A) muestra la tendencia de los datos de la concentración de proteína total. Se aplicó una ANOVA de una vía con los valores de la concentración de proteína total, donde se encontraron los valores mayores con las concentración de 0.5 mg/g de NanoPET ( $p < 0.01$ ), mientras que para las concentraciones de 0.25, 0.5 mg/g de NanoPET y el tratamiento control no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

La Figura 23 B) describe la cuantificación de glucosa por tratamiento de NanoPET. Esta evaluación se llevó a cabo aplicando una ANOVA de una vía, donde los valores de 0.25, 0.5 y 1 mg/g de NanoPET muestran una tendencia de aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento control.



**Figura 23.** Cuantificación de la concentración de proteína total (A) y glucosa (B) en la hemolinfa de camarones blancos expuestos a 4 diferentes conentraciones de NanoPET. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde la significancia estadística representa \* ( $p > 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).

La cuantificación de la concentración de colesterol en la hemolinfa de los organismos, descrita en la Figura 24 A) se analizó aplicando una ANOVA de una vía donde los valores 0.25, 0.5 y 1 mg/g de NanoPET no mostraron valores mayores significativos ( $p > 0.05$ ) con respecto al tratamiento control.

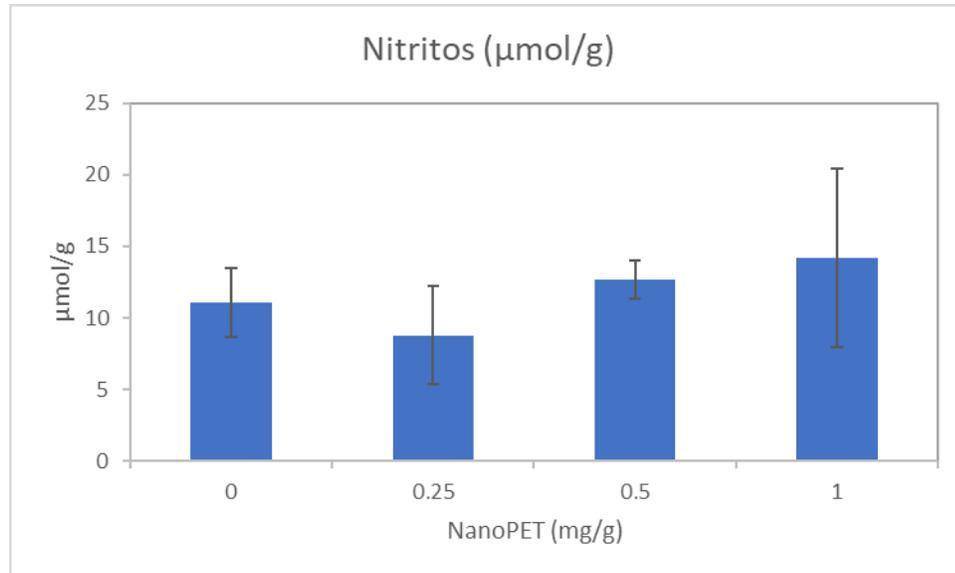


**Figura 24** Cuantificación de la concentración de colesterol (A) y triglicéridos (B) en la hemolinfa de camarones blancos expuestos a 4 diferentes conentraciones de NanoPET. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde ningún tratamiento mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

### 3.8 Concentración de nitritos en hepatopáncreas

Los nitritos son un indicador de estrés oxidativo. Los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) son moléculas muy reactivas que pueden reaccionar con las macromoléculas de la célula y provocarle un daño irreversible. Durante el proceso inflamatorio, ocurre un aumento de la producción de óxido nítrico (NO). El NO producido en exceso reacciona con el anión superóxido, dando lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), especie altamente reactiva capaz de nitrar residuos de tirosina, oxidar lípidos y enzimas críticas del metabolismo intermediario, y romper cadenas de ADN. El ONOO<sup>-</sup> en su forma aniónica es capaz de protonarse a pH fisiológico para dar ácido peroxinitroso (ONOOH) que rinde OH y nitritos.

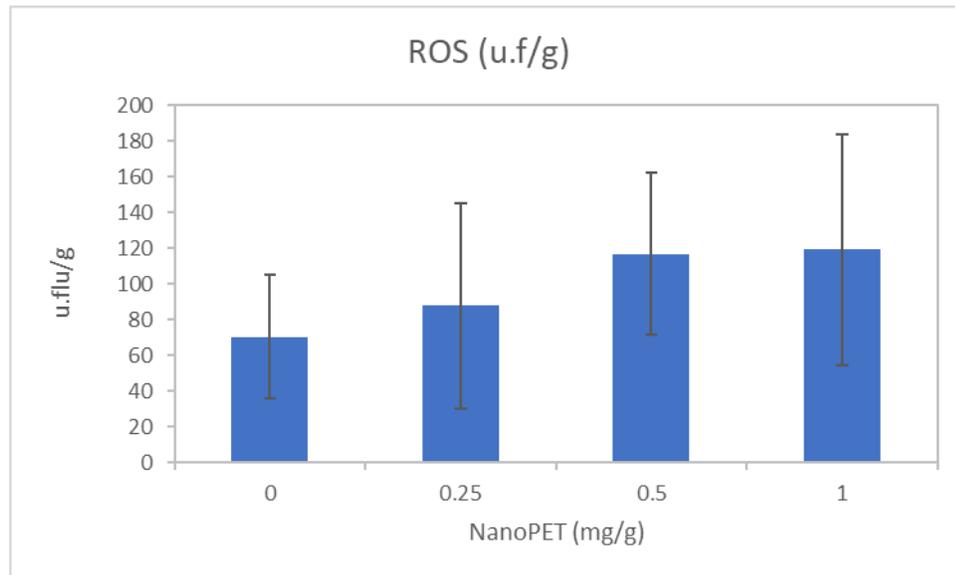
La Figura 25 es el resumen de la concentración de nitritos por gramo de hepatopáncreas de los camarones blancos que fueron expuestos a los 4 tratamientos de NanoPET. Se observa que prácticamente se mantienen similares los valores de 0.25 y 0.5 mg/g respecto al tratamiento control, mientras que la concentración de 1 mg/g de NanoPET muestra un ligero aumento, pero no fue significativamente diferente ( $p > 0.05$ ).



**Figura 25** Cuantificación de la concentración de nitritos totales, se reportan en µmol/gramo de hepatopáncreas, en el hepatopáncreas de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde ningún tratamiento mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

### 3.9 Especies Reactivas de Oxígeno en el hepatopáncreas

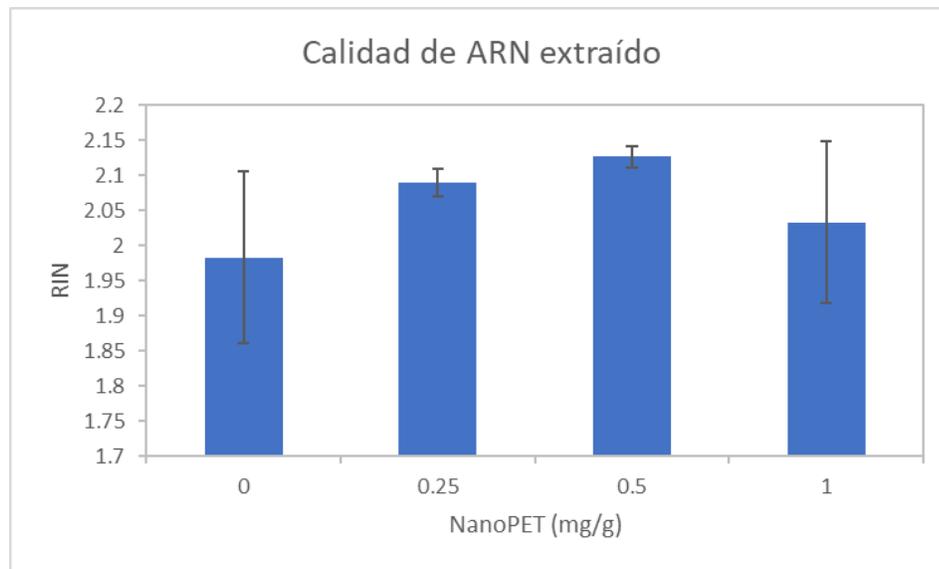
En la Figura 26 se muestra el promedio de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en el hepatopáncreas de los camarones blancos por concentración de NanoPET, después de estar expuestos a nanoplasticos de PET durante 33 días. El análisis se realizó de forma indirecta a través de la cuantificación de la fluorescencia del reactivo H<sub>2</sub>DCFDA el cual es reducido por las ROS generadas en el citoplasma de la célula. Se tomó como referencia al grupo control, al cual no se le agregaron nanoplasticos a su dieta, y ninguno de los tratamientos mostró diferencia significativa con respecto al tratamiento control ( $p > 0,05$ ), sin embargo, el ligero incremento en los valores de 0.25, 0.5 y 1 mg/g de NanoPET mostraron un leve incremento con respecto al tratamiento control, lo que puede representarse debido a una inflamación en las células del hepatopáncreas.



**Figura 26.** Cuantificación de la concentración de ROS con respecto a la proteína total en el hepatopáncreas de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde ningún tratamiento mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

### 3.10 Extracción de ADN genómico

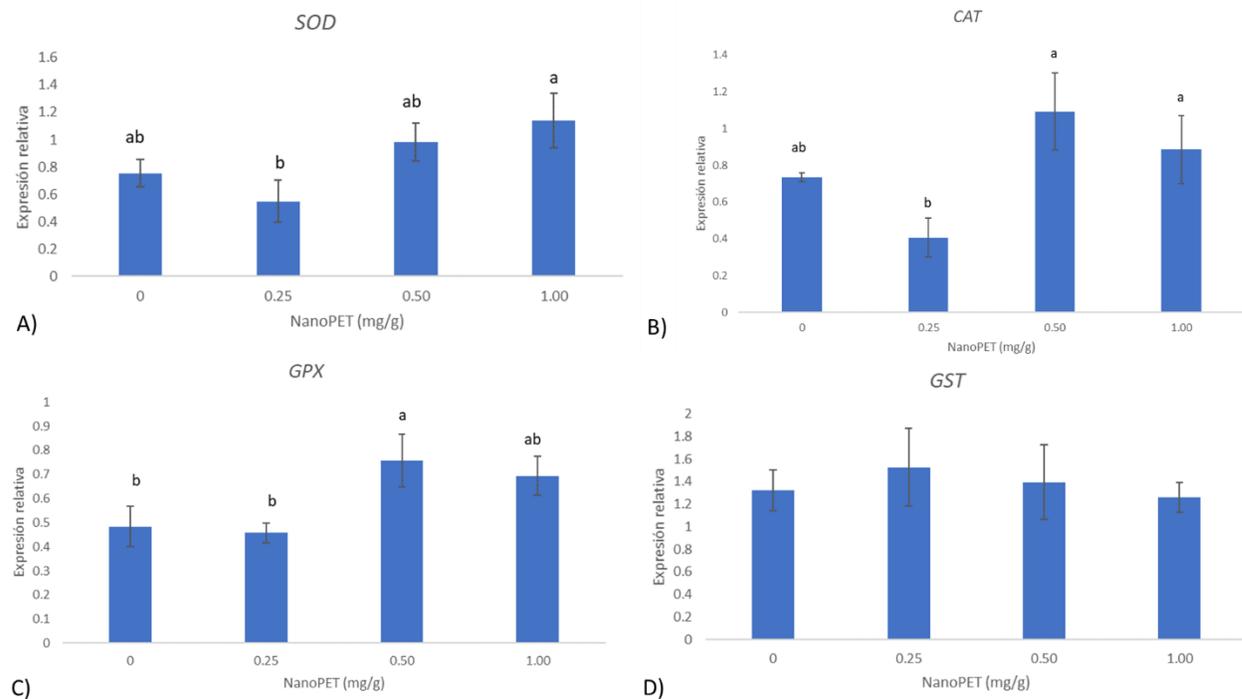
La Figura 27 cuantifica el promedio, por tratamiento, del RIN (RNA Integrity Number) mejor conocido como la calidad del ARN extraído. El RIN obtenido muestra una adecuada calidad de ARN ya que se muestra entre 1.85 y 2.14.



**Figura 27.** Cuantificación de la calidad del RIN en el hepatopáncreas de camarones blancos expuestos a 4 diferentes concentraciones de NanoPET. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde ningún tratamiento mostró una significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

En la Figura 28 se muestra la expresión genética relativa del hepatopáncreas de los camarones blancos que fueron alimentados con 4 concentraciones diferentes de NanoPET (0, 0.25, 0.5, 1 mg/g). Se evaluaron cuatro genes del estrés oxidativo: superóxido dismutasa (*SOD*), catalasa (*CAT*), glutación peroxidasa (*GPx*) y glutation-s-transferasa (*GST*).

La Figura 28 A) muestra la tendencia de los datos de la concentración de proteína total. Se aplicó una ANOVA de una vía con los valores de la expresión genética relativa de *SOD*, donde se encontraron los valores mayores con la concentración de 1 mg/g de NanoPET ( $p < 0.05$ ), mientras que para las concentraciones de 0.25 mg/g de NanoPET fue significativamente menor. En la Figura 28 B) la tendencia en la expresión genética de *CAT* se obtuvo aplicando una ANOVA de una vía y mientras que el valor más bajo fue con la concentración de 0.25 mg/g de NanoPET, los valores mayores se encontraron en las concentraciones 0.5 y 1 mg/g de NanoPET. En los resultados de expresión genética de *GPx* (Figura 28 C)), en el tratamiento con 0.5 mg/g de NanoPET se encontraron los valores mayores ( $p < 0.05$ ) y los menores para las concentraciones de 0 y 0.25 mg/g de NanoPET. La expresión genética de *GST* (Figura 28 D)) no mostró un aumento significativo para ninguno de los tratamientos de NanoPET ( $p > 0.05$ ).



**Figura 28.** Efectos de nanoplásticos de PET en la expresión genética de estrés oxidativo en camarón blanco del Pacífico. A) Expresión genética de superóxido dismutasa (*SOD*). B) Expresión genética de catalasa (*CAT*). C) Expresión genética de glutatión peroxidasa (*GPX*). D) Expresión genética de glutatión-s-transferasa (*GST*). Los resultados representan el promedio  $\pm$  error estándar,  $n=6$ . Diferentes letras encima de las barras representan diferencia significativa.

## Capítulo 4. Discusión

---

Se realizó un ensayo preliminar en el que se intentó detectar la presencia del NanoPET por medio de fluorescencia, aprovechando las propiedades del Rojo Nilo con el que se tiñó el material. Una vez que se integraron las nanopartículas de al alimento de los camarones se realizaron varias diluciones en etanol (70%) y agua destilada para conocer el espectro de emisión del alimento y poder confirmar su presencia en el alimento y en dado caso poder rastrearlo. Sin embargo, las mediciones no fueron concluyentes debido al enmascaramiento de las partículas de NanoPET por parte de la fluorescencia emitida por el alimento preparado en pellets. De los resultados de fluorescencia obtenidos del alimento para el tratamiento control y del alimento enriquecido con nanopartículas plásticas de PET, se puede concluir que, dentro de los componentes del alimento, existe algún compuesto que presentó una fluorescencia cercana a las longitudes de excitación y emisión del Rojo Nilo, dificultando su identificación.

Cuando el alimento con concentración 1mg/g de NanoPET fue evaluado por fluorescencia éste emitió una señal en un rango de 558/636 nm de apenas 3 unidades de diferencia con el alimento control, sin NanoPET, es decir de concentración 0mg/g. Confirmando así que no era un resultado concluyente para poder brindar conclusiones sobre el rastro de los nanoplásticos pero si su presencia en el alimento.

Durante el cultivo de los organismos se aseguró de cuidar los parámetros fisiológicos de los mismos con el fin de procurar una calidad de vida saludable para los organismos y también se intentó mitigar el estrés ambiental para poder detectar el efecto de los nanoplásticos desde el punto de vista nutricional y metabólico. Se monitoreo la temperatura, el pH, la salinidad y la concentración de nitritos en el agua. Coates et al. reportaron en el 2020 la importancia de la evaluación de distintos factores ambientales y bioquímicos que estresan a distintos crustáceos. Explica que debido a que los crustáceos son especies ectotérmicas las variaciones en la temperatura afectan directamente sus procesos fisiológicos. También menciona la importancia de mantener los niveles de amoníaco estables para que el fitoplancton logre absorberlo y proporcionar suficiente oxígeno para el cultivo de camarones (Coates y Söderhäll, 2020).

En el tratamiento de la dieta de 1 mg/g de NanoPET sobrevivieron 5 de los 6 camarones a la exposición de nanoplásticos, lo que significa que hubo un porcentaje de supervivencia del 83.33%. Como menciona Li, et al. (2020) las concentraciones más altas de nanoplásticos, (se observaba una menor tasa de supervivencia).

Para evaluar el desarrollo de los organismos se comparó la tasa de aumento de peso y longitud ganado por los organismos durante 33 días. A lo largo de esas semanas, los camarones fueron alimentados con 4 concentraciones diferentes de NanoPET (0, 0.25, 0.5 y 1 mg/g). La ganancia de peso en los organismos no mostró cambios o efectos derivados de los nanoplásticos, mientras que en la ganancia de longitud las concentraciones de 0.25 y 1 mg/g se observó un aumento significativo con respecto al control reflejando que esos organismos asimilaron mejor esos alimentos permitiendo un aumento de talla. La ganancia en las proporciones del tamaño de los organismos que fueron alimentados con el tratamiento con concentración de 1 mg/g de NanoPET se basa en el principio del efecto hormético, el cual explica que el organismo logra adaptarse al medio aun estando expuesto a un estresor (Li et al., 2020).

De acuerdo con las observaciones de Sun et al. (2012) el efecto originado por la estimulación por microplásticos se veían relacionadas con respuestas adaptativas y agentes que permiten que los organismos presenten una mayor fuerza y resistencia biológica.

Para analizar el efecto de los organismos a la exposición de NanoPET se evaluó el perfil hematológico de los camarones, es decir, se evaluaron los parámetros hematológicos y bioquímicos para conocer las condiciones de salud de los organismos.

El perfil hematológico engloba el análisis de la concentración glucosa, proteína total, colesterol y triglicéridos de los camarones. El efecto desatado por las nanopartículas de PET se vio reflejado en los altos niveles de glucosa de las tres concentraciones (0.25, 0.5 y 1 mg/g NanoPET), indicando que los niveles de glucógeno disminuyen, obligando al organismo a utilizar sus reservas energéticas para poder combatir el agente estresor y al mismo tiempo responder ante los estímulos de su sistema inmune (Coates y Söderhäll, 2020). En los resultados de Coates y Söderhall (2020) se reportó que los aumentos de glucosa eran consistentes como una respuesta del organismo frente a un estresor. Esto fue probado en crustáceos como camarones, cigalas y bivalvos que fueron expuestos a microplásticos de diferentes tamaños.

Aunque no se midieron los niveles de glucógeno está reportado que los niveles de glucógeno son inversamente proporcionales a los de la glucosa. La concentración de la glucosa en la hemolinfa se puede tomar como un biomarcador de estrés agudo mientras que los niveles de proteína en la hemolinfa son un indicador de estrés crónico del organismo (Bonvillain et al., 2012).

EL aumento significativo de proteína en la hemolinfa en los organismos alimentados con la concentración 0.5 mg/g de NanoPET reflejan inmunocompetencia para el combate de agentes estresores, sin embargo,

también fueron los organismos de este tratamiento los cuales no presentaron un crecimiento significativo con respecto al control. Lo anterior, sugiere que los organismos gastaban energía intentando contender contra los nanoplásticos (proceso de desintoxicación). Coates y Söderhall (2020) reportaron que no solo los crustáceos, pero que todos los animales marinos expuestos a microplásticos consumen mucha energía intentando desintoxicarse y tratando de metabolizarlos, aparte de que al mismo tiempos bajan sus defensas y se vuelven vulnerables.

Para complementar, también se midieron los niveles de colesterol y triglicéridos, y es que el colesterol es un esteroide importante en los animales pues además de servir como precursor de componentes fisiológicos (Shan et al., 2019) también provee y almacena energía junto con los triglicéridos (Wang et al., 2019). Al momento del análisis se mostró que los niveles de colesterol y de triglicéridos se mantuvieron estables en los cuatro grupos de NanoPET. Vale la pena mencionar que los camarones no tienen la capacidad de sintetizar colesterol de *novo*, por lo que este es acumulado eficientemente (Kanazawa, 2001). Por lo tanto, el proceso de aprovechamiento de reservas de energía lipídicas no se vio afectado por la exposición a partículas nanoplásticas.

La evaluación de los indicadores metabólicos en los camarones se llevó a cabo comparando el valor del grupo control con el de cada uno de los grupos expuestos a las nanopartículas plásticas de PET y como señala (Mercier, 2006 y 2009) los niveles de glucosa, proteína total, triglicéridos y colesterol varían dependiendo las condiciones en la que se estén cultivando los camarones y también varían por las concentraciones nutrimentales de sus dietas. El principio de diversidad de análisis explicado Mercier et al. (2009) es aplicable en este ensayo ya que considerando las particularidades en el cultivo de los organismos alimentados con dietas preparados con NanoPET (0.25, 0.5 y 1 mg/g) , es solo posible comparar el grupo control con las diferentes concentraciones de NanoPET.

También se realizaron pruebas en la glándula digestiva (hepatopáncreas) de los camarones para analizar las respuestas celulares ante la ingesta de NanoPET. Se analizó la concentración de  $\text{NO}_2$  y ROS en el tejido. El análisis de  $\text{NO}_2$  es un biomarcador que indica una activación del sistema inmunológico ya que al reconocer agentes patógenos, se estimula una respuesta humoral por parte del organismo (Rodríguez-Ramos et al., 2016) ante el ligero aumento de  $\text{NO}_2$ . Aún así se puede especular que la generación de óxido nítrico como respuesta del sistema inmune contribuyó a la inflamación celular del hepatopáncreas (Pereira et al., 2016).

Recientemente Li et al. (2021) encontraron que la exposición de la especie *Daphnia pulex* con nanoplásticos mostró un desequilibrio significativo entre el sistema antioxidante y la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), pues revela la toxicidad por parte de las nanopartículas plásticas. El análisis en las muestras de ROS de los camarones blancos (*L. vannamei*) no mostró un aumento significativo en ninguna de las concentraciones de NanoPET. Aunque se notó un ligero aumento en los ROS conforme aumentaba la concentración de NanoPET, podría ser que esto haya ocasionado la activación de la expresión de genes relativos al sistema antioxidante y por ende los haya neutralizado. El sistema antioxidante funciona como biomarcador de los efectos ocasionados por nanoplásticos.

Las enzimas super oxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutathion peroxidasa (GPX) y glutathion-s-transferasa (GST) son las principales enzimas antioxidantes empleadas por los organismos marinos para reducir los efectos negativos derivados de la excesiva producción de ROS (Li et al., 2020). Los organismos usaron estrategias de defensa antioxidante y debido a la expresión genética de SOD, CAT y GPx, lograron mitigar la presencia de ROS en las células del hepatopáncreas.

En esta tesis la expresión del gen SOD en la concentración 1 mg/g fue significativamente mayor que la de 0.25 mg/g de NanoPET. La SOD protege a la célula de reacciones tóxicas derivadas de ROS, si se tiene una expresión constante de este gen, el crecimiento y la reproducción se pueden ver afectados. Los organismos asimilaron el alimento con 1 mg/g de NanoPET y también presentó la mayor síntesis de SOD, reflejando un constante trabajo de neutralización de radicales libres derivados de oxígeno en  $H_2O_2$ . En esta misma concentración también fue significativa la expresión del gen CAT, confirmando la síntesis de la enzima catalasa necesaria para descomponer el  $H_2O_2$  y prevenir un daño celular.

Los organismos alimentados con la dieta del tratamiento 0.25 mg/g de NanoPET mostró una significativa asimilación del alimento reflejada en el aumento de longitud de los organismos y presentó la menor expresión genética de SOD y CAT de los tres tratamientos con nanoplásticos, así como un bajo nivel de ROS en el hepatopáncreas.

Para la concentración 0.5 mg/g de NanoPET la expresión del gen CAT también presentó una expresión genética significativamente menor que los demás tratamientos, señalando la existencia de peróxido de hidrógeno en las células del hepatopáncreas. Debido a la alta capacidad metabólica del hepatopáncreas se espera que se generen grandes cantidades de ROS y como resultado CAT aumente su actividad (Tavares-Sánchez et al., 2004). Aunque al momento del análisis del tejido de hepatopáncreas no se detectaron ROS, por lo que se concluyó que el tejido sufría una inflamación (EFSA, 2016) que se vio contrarrestada, ya que

la expresión genética de SOD, CAT y GPX sugieren que la respuesta inmune de los organismos se vio activada por la constante aparición de ROS y su constante neutralización.

Como se observó en las tres concentraciones de NanoPET (0.25, 0.5 y 1 mg/g), se registró un incremento en la expresión de CAT, confirmando así la constante actividad neutralizante de ROS. Bajas concentraciones de nanoplasticos aumentan la producción de ROS en las células de los organismos, estimulando la expresión genética de genes relacionados con el sistema antioxidante, ayudando a eliminar el exceso de ROS de las células evitando que el estrés oxidativo rompa el equilibrio humoral (Li et al., 2020).

La concentración 0.5 mg/g de NanoPET presentó un aumento significativo en GPX con respecto a 0.25 mg/g, señalando su actividad de convertir peróxido de hidrógeno en agua y bloqueando el radical hidroxilo para evitar así futuro daño celular. Los niveles de SOD, CAT y GPX para la concentración de 0.25 mg/g fueron los más bajos en comparación con los 4 tratamientos, apuntando a una ligera afectación del sistema antioxidante, solamente presentó un ligero aumento en la expresión del gen GST. La célula se ve en la necesidad de expresar GST cuando detecta xenobióticos dentro de esta y poder así lidiar con organismos que la célula detecta como externas (Coates y Söderhäll, 2020).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Los resultados obtenidos muestran que la exposición de camarones blancos a nanopartículas plásticas de PET si reflejó una afectación a nivel genética y celular pues la exposición crónica a través del alimento desencadenó la expresión de genes relacionados con el sistema antioxidante de los crustáceos.

Evaluar el perfil hematológico de los organismos fue una de las herramientas que mejor ayudaron a detectar signos de estrés en la hemolinfa, causado por la exposición a NanoPET (0.25, 0.5 y 1 mg/g). Los altos niveles de glucosa sugieren que los organismos sufrieron estrés agudo durante la duración del bioensayo. También, aunque se vio reflejado una ligera inflamación celular, no hubo aumento significativo de ROS en el hepatopáncreas.

Fue hasta la evaluación de la expresión genética del tejido del hepatopáncreas, cuando la expresión de SOD y CAT confirmaron la existencia de ROS en la célula y también el constante trabajo celular neutralizando las especies reactivas de oxígeno. Esta expresión de enzimas ayuda a comprobar la asimilación digestiva de las nanopartículas plásticas de PET, reflejando la interacción de enzimas antioxidantes en la célula.

El desarrollo de este proyecto ayudó a tener un acercamiento a los resultados que los efectos de la exposición de nanoplásticos suministrados en el alimento y lo que provocó en el camarón blanco (*L. vannamei*). La asimilación de estas partículas de PET mostró una estimulación en el crecimiento del camarón y una activación del sistema antioxidante de los organismos.

Este estudio permite conocer algunas de las afectaciones por parte de nanopartículas de PET en el camarón blanco, sin embargo, de acuerdo al valor nutricional, económico y ambiental de los camarones blancos conviene continuar con el análisis del daño que la contaminación plástica puede ocasionar. Aunque los daños se presentaron de forma pasiva es importante mencionar que no deja de ser un tema sensible el de la contaminación plástica.

Se sugiere continuar el trabajo con grupos más grandes de organismos para poder tomar muestras experimentales de manera crónica y aguda para definir si es el tiempo o la concentración de nanoplásticos un factor determinante en la posible respuesta tóxica de los organismos.

## Literatura citada

---

- Abud, M., Morales, y Angel, J. 2008. Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei. Recuperado el 06/07/2021 [http://www.cesasin.com.mx/LIBRO\\_PATOLOGIA0EINMUNOLOGIA.pdf](http://www.cesasin.com.mx/LIBRO_PATOLOGIA0EINMUNOLOGIA.pdf)
- Aguilar-Guzmán, J. C. 2020. Preparación y Caracterización de Nanopartículas de Tereftalato de Polietileno (PET) y La Evaluación de Su Toxicidad in Vitro. Tesis de Maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 68 pp.
- Amir, A., Farhad, S. M., Haque, N., y Kumar, B. 2021. Chemosphere Understanding the fate of nano-plastics in wastewater treatment plants and their removal using membrane processes. *Chemosphere*, 284(June), 131430. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131430>
- Araújo, B. C., Flores-Galvez, K., Honji, R. M., Barbosa, V. M., Viana, M. T., Tinajero, A., y Mata-Sotres, J. A. (2020). Arachidonic acid effects on the overall performance, fatty acid profile, hepatopancreas morphology and lipid-relevant genes in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 523(March), 735207. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735207>
- Banfield, J. F., y Zhang, H. 2001. Nanoparticles in the environment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 44, 1–58. <https://doi.org/10.2138/rmg.2001.44.01>
- Baur, E., Osswald, T. A., Rudolph, N., Baur, E., Osswald, T. A., y Rudolph, N. 2019. Plastic Materials. *Plastics Handbook*, 1, 337–578. <https://doi.org/10.3139/9781569905609.005>
- Bonvillain, C. P., Rutherford, D. A., Kelso, W. E., y Green, C. C. 2012. Physiological biomarkers of hypoxic stress in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* from field and laboratory experiments. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 163(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.04.015>
- Brock, J. A., y Main, K. L. 1994. Guide to the Common Problems and Diseases of cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute.
- Bruder, U., y Bruder, U. 2015. Polymers and Plastics. *User's Guide to Plastic*, C, 5–8. <https://doi.org/10.3139/9781569905739.001>
- Cai, H., Xu, E. G., Du, F., Li, R., Liu, J., y Shi, H. 2021. Analysis of environmental nanoplastics: Progress and challenges. *Chemical Engineering Journal*, 410, 128208. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128208>
- Ceccaldi, H. J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. 243–259.
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., y Suh, S. 2020. Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>

- Coates, C. J., y Söderhäll, K. 2020. The stress–immunity axis in shellfish. *Journal of Invertebrate Pathology*, October, 107492. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107492>
- Erni-cassola, G., Gibson, M. I., y Thompson, R. C. 2017. Lost, but found with Nile red; a novel method to detect and quantify small microplastics (20  $\mu\text{m}$  – 1 mm) in environmental samples. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04512>
- EFSA. 2016. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*, 14(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>
- FAO.2018. Fisheries and Aquaculture Department. Consultado el 24 diciembre de 2020, de: <https://www.fao.org/fishery/statistics/yearbook/en>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., y Law, K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made [Producción, uso y destino de todos los plásticos jamás fabricados]. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.1700782>
- Henderson, L., y Green, C. 2020. Making sense of microplastics? Public understandings of plastic pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 152, 110908. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110908>
- Hirt, N., y Body-Malapel, M. 2020. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00387-7>
- Hopkin, S. P., y Nott, J. A. (1980). Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus Maenas* (L.) with special reference to the b cells in the hepatopancreas. 891–907.
- Jambeck, J. R., Ji, Q., Zhang, Y.-G., Liu, D., Grossnickle, D. M., y Luo, Z.-X. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 764–768. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1260879>
- Kanazawa, A. 2001. Sterols in marine invertebrates. *Fisheries Science*, 67(6), 997–1007. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00354.x>
- INAPESACA. Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola. Consultado el 24 de diciembre de 2020, de: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5615929&fecha=15/04/2021](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5615929&fecha=15/04/2021)
- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., y Rothen-Rutishauser, B. 2019. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. In *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>
- Li, Y., Liu, Z., Li, M., Jiang, Q., Wu, D., Huang, Y., Jiao, Y., Zhang, M., y Zhao, Y. 2020. Effects of nanoplastics on antioxidant and immune enzyme activities and related gene expression in juvenile *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Hazardous Materials*, 398(March), 122990.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122990>

- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- McGaw, I. J., y Curtis, D. L. 2012. A review of gastric processing in decapod crustaceans. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0730-3>
- Mercier, Laurence, Elena Palacios, Ángel I. Campa-Córdova, Dariel Tovar-Ramírez, Roberto Hernández-Herrera, and Ilie S. Racotta. 2006. “Metabolic and Immune Responses in Pacific Whiteleg Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Exposed to a Repeated Handling Stress.” *Aquaculture* 258 (1–4): 633–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.036>.
- Mercier, L., Racotta, I. S., Yepiz-Plascencia, G., Muhlia-Almazán, A., Civera, R., Quiñones-Arreola, M. F., Wille, M., Sorgeloos, P., y Palacios, E. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. *Aquaculture Research*, 40(16), 1849–1863. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02291.x>
- ONU. 2015. Organización de las Naciones Unidas. Consultado el 09 de abril del 2021, de: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>
- Oliveira, M., Almeida, M., y Miguel, I. 2019. A micro(nano)plastic boomerang tale: A never ending story? *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 112, 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.005>
- Pereira, T. C. B., Campos, M. M., y Bogo, M. R. 2016. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *Journal of Applied Toxicology*, 36(7), 876–885. <https://doi.org/10.1002/jat.3303>
- Piccardo, M., Renzi, M., y Terlizzi, A. 2020. Nanoplastics in the oceans: Theory, experimental evidence and real world. *Marine Pollution Bulletin*, 157(May), 111317. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111317>
- Plastic Europe, 2020. Plastic – the Facts 2020. Consultado el 02 de febrero de 2020, de <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/4312-plastics-facts-2020>.
- Pongrácz E. 2010. The Environmental Impacts of Packaging. En: Kutz, M (Ed), *Environmentally Conscious Materials and Chemicals Processing*. John Wiley y Sons. Hoboken. pp. 237-278.
- Rios Mendoza, L. M., Karapanagioti, H., y Álvarez, N. R. 2018. Micro(nanoplastics) in the marine environment: Current knowledge and gaps. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 1, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.004>
- Rodríguez-Hernández, A. G., Muñoz-Tabares, J. A., Aguilar-Guzmán, J. C., y Vazquez-Duhalt, R. 2019. A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production.

- Environmental Science: Nano, 6(7), 2031–2036. <https://doi.org/10.1039/c9en00365g>
- Rodríguez-Ramos, T., Carpio, Y., Bolívar, J., Gómez, L., Estrada, M. P., y Pendón, C. 2016. Nitric oxide synthase-dependent immune response against gram negative bacteria in a crustacean, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 50, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.019>
- Schmid, C., Cozzarini, L., y Zambello, E. 2021. Microplastic's story. *Marine Pollution Bulletin*, 162(October 2020), 111820. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111820>
- Shan, H., Geng, Z., Ma, S., y Wang, T. 2019. Comparative study of the key enzymes and biochemical substances involved in the energy metabolism of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, with different ammonia-N tolerances. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 221(December 2018), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.001>
- Sun, T., Zhan, J., Li, F., Ji, C., y Wu, H. 2021. Effect of microplastics on aquatic biota: A hormetic perspective. *Environmental Pollution*, 285(April), 117206. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117206>
- Tavares-Sánchez, O. L., Gómez-Anduro, G. A., Felipe-Ortega, X., Islas-Osuna, M. A., Sotelo-Mundo, R. R., Barillas-Mury, C., y Yepiz-Plascencia, G. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*: Molecular cloning and protein detection. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 138(4), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.03.005>
- Timmons, M. B., Holder, J. L., y Ebeling, J. M. 2006. Application of microbead biological filters. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.07.003>
- Wagner, S., y Reemtsma, T. 2019. Things we know and don't know about nanoplastic in the environment. *Nature Nanotechnology*, 14(4), 300–301. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0424-z>
- Wang, Z., Qu, Y., Zhuo, X., Li, J., Zou, J., y Fan, L. 2019. Investigating the physiological responses of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to acute cold-stress. *PeerJ*, 2019(7), 1–15. <https://doi.org/10.7717/peerj.7381>
- Wigginton, N. S., Haus, K. L., y Hochella, M. F. 2007. Aquatic environmental nanoparticles. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(12), 1306–1316. <https://doi.org/10.1039/b712709j>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.015>