

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
CAMPUS ENSENADA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



“EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE TEREFALATO DE
POLIETILENO (PET) EN DOS SISTEMAS *IN VITRO*”

PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ANDREA BERNAL JIMÉNEZ

DIRECTORAS:

DRA. EUNICE VARGAS VIVEROS

DRA. ANA GUADALUPE RODRÍGUEZ HERNANDEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. JUNIO 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE TEREFTALATO DE
POLIETILENO (PET) EN DOS SISTEMAS *IN VITRO*

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ANDREA BERNAL JIMÉNEZ

Aprobada por:



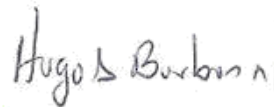
Dra. Ana Guadalupe Rodríguez
Hernández
Directora



Dra. Eunice Vargas Viveros
Co-directora



Dr. Zaúl García Esquivel
Sinodal



Dr. Hugo Alejandro Borbón Núñez
Sinodal



Dr. Franklin David Muñoz Muñoz
Sinodal

DEDICATORIA

Para mi Madre, María Eugenia Jiménez.

Este trabajo de tesis es dedicado a ti con mi cariño, amor y respeto. Tú que me has dado todo lo que tengo, con tu esfuerzo y sacrificio. Que me has apoyado con paciencia y comprensión desde el principio, hasta el final de mi carrera universitaria. Sin ti, nada de esto sería posible. Gracias por todo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi alma mater, la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (FIAD) que me brindó una formación académica y profesional para ejercer como Ingeniero en Nanotecnología.

Agradezco al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que me recibió y proporcionó la infraestructura y recursos para la realización de este proyecto de tesis.

Al Laboratorio de Bionanotecnología CNYN-UNAM, por brindarme sus laboratorios y equipo. A las técnicas de laboratorio, Dra. Katrin Quester y M.C. Itandehui Betanzo Gutiérrez, por su asistencia técnica, disposición, conocimientos y paciencia.

Al Oc. Filiberto Núñez Cebrero, técnico del laboratorio de microalgas marinas, por su tiempo, ayuda y conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del proyecto SINANOTOX PN-2017-01-4710

A mi directora de tesis, Dra. Ana Rodríguez, que me otorgó su confianza, conocimiento, sabiduría, cariño, paciencia y me ayudó a crecer como persona y profesional a lo largo del proyecto.

A mi comité de tesis, Dra. Eunice Vargas Viveros, Dr. Franklin Muñoz Muñoz, Dr. Hugo Borbón Núñez, Dr. Zaul García Esquivel, que dieron de su tiempo para revisar este trabajo y proporcionarme sugerencias y comentarios.

Dr. Rafael Vázquez, jefe del departamento del laboratorio de bionanotecnología del centro de nanociencias y nanotecnología UNAM

A mis compañeros de trabajo, Sheila, Cristóbal, Gabriela, Mauricio y Gabriel que trabajaron a mi lado y me apoyaron en todo momento y me tendieron su mano.

A mis amigos y compañeros de universidad que estuvieron conmigo a lo largo de mi carrera.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Plástico.....	1
1.2	Crecimiento e impacto ambiental.	1
1.3	Micro/nano plásticos.	3
1.4	Tereftalato de polietileno.	4
1.5	Microalgas.....	4
1.6	Macrófagos.	6
2	ANTECEDENTES.....	8
3	JUSTIFICACIÓN	9
4	HIPÓTESIS	9
5	OBJETIVO GENERAL.....	9
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
6	METODOLOGÍA	10
6.1	Obtención de nanopartículas de PET (primera etapa).	10
6.1.1	Obtención por trituración mecánica.	10
6.1.2	Obtención por disolución ácida.	10
6.2	Caracterización de nanopartículas (segunda etapa).	11
6.2.1	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	11
6.2.2	Espectroscopía de luz dinámica (DLS).	11
6.2.3	Difracción de rayos X (XRD).	11
6.2.4	Análisis Termo-gravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido (TGA y DSC).	13
6.3	Evaluación toxicológica (tercera etapa).	13
6.3.1	Marcaje fluorescente de nanopartículas.	13
6.3.2	Ensayo de cultivo de células macrófago RAWBLUE.	13
6.3.2.1	Conteo celular.....	14
6.3.2.2	Viabilidad y proliferación.....	14
6.3.2.3	Concentración de nitritos.	16
6.3.2.4	Observación por microscopía de contraste de fases y fluorescencia.	17
6.3.2.5	Observación por microscopía confocal.	17
6.3.3	Ensayo de cultivo de microalgas.....	18
6.3.3.1	Solución stock de NPETd.	18
6.3.3.2	Cultivo algal.	18

6.3.3.3	Incubación de microalgas en presencia de NPETd.....	19
6.3.3.4	Viabilidad y proliferación de cultivo de microalga.....	19
6.3.3.4.1	Densidad Óptica.	19
6.3.3.4.2	Citometría de flujo.	20
6.3.3.5	Observación por microscopía confocal.	20
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
7.1	Obtención y caracterización de NPET.	21
7.1.1	Morfología y dimensiones.....	21
7.1.2	Difracción de rayos X (XRD).	24
7.1.3	Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA & DSC).	25
7.2	Evaluación toxicológica.....	26
7.2.1	Ensayo de cultivo celular.	26
7.2.1.1	Proliferación y Viabilidad.....	26
7.2.1.2	Concentración de nitritos.	28
7.2.1.3	Observación de microscopía de contraste de fases fluorescencia.	29
7.2.1.4	Observación de microscopía confocal.....	32
7.2.2	Ensayo con microalgas.	34
7.2.2.1	Viabilidad y proliferación del cultivo de microalgas.	34
7.2.2.1.1	Densidad óptica.	34
7.2.2.1.2	Citometría de flujo.	35
7.2.2.2	Observación de microscopía confocal.....	37
8	CONCLUSIONES.....	39
9	Referencias y bibliografía	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción global de resina polimérica y fibra (producción de plástico), medida en toneladas métrica. Grafica obtenida de https://ourworldindata.org/plastic-pollution -----	2
Figura 2. Estructura general del monómero de tereftalato de polietileno. -----	4
Figura 3. Ejemplo de cadena alimenticia marina, en el cual, el fitoplancton es la base y se conoce como productor primario.-----	5
Figura 4. Micrografía de <i>Isochrysis galbana</i> . Obtenida de https://algaeresearchsupply.com/pages/isochrysis . -----	6
Figura 5. Principales estados de polimerización de los macrófagos. (Obtenida de https://www.promab.com/macrophage-polarization-assay). -----	7
Figura 6. A) Tabla cristalográfica 00-060-0989, B) Parámetros de red del tereftalato de polietileno y C) patrón de rayos X característico del material. -----	12
Figura 7. Esquema de cámara Neubauer. -----	14
Figura 8. Esquema representativo del ensayo de viabilidad para A) NPETd y B) NPETn. -----	15
Figura 9. Esquema representativo para el ensayo de Greiss, donde A) es la placa para las muestras de NPETd y B) es la placa para las muestras NPETn y NPETd en un intervalo de 24 horas. -----	17
Figura 10. Diluciones seriadas de NPETd en agua ultra pura. -----	18
Figura 11. A) Imágenes de TEM y B) diámetro hidrodinámico de las muestras NPETn.-----	22
Figura 12. A) Diámetro hidrodinámico e B) imágenes de TEM campo claro de NPETd. Obtenido de Rodríguez-Hernández et al. 2019. -----	23
Figura 13. Patrón de Difracción de XRD, de A) PET control, B) NPETn, C) NPETd y D) comparación de las 3 muestras. -----	24
Figura 14. Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido de A) PET control, B) NPETn, C) NPETd y D) la comparación de las 3. -----	25
Figura 15. Viabilidad de células macrófago RAWBlue en presencia de NPETn, por ensayo colorimétrico Alamar Blue en un tiempo de 96 horas. -----	26
Figura 16. Viabilidad de Células macrófago RAWBlue en presencia de NPETd, por ensayo colorimétrico Alamar Blue en un tiempo de 96 horas. -----	27
Figura 17. Producción de nitritos de macrófagos RAWBlue en presencia de NPETn y NPETd en un tiempo de 24 horas.-----	28

Figura 18. Producción de nitritos de macrófagos RAWBlue en presencia de NPETd, media cada 24 horas hasta 4 días de incubación in vitro. -----	29
Figura 19. Imágenes de fluorescencia de macrófagos cultivados en presencia de NPETn, en las cuales se puede observar una partícula en el centro del campo de visión. Bajo objetivo 10X. -----	30
Figura 20. Detalle amplificado de las imágenes de fluorescencia de macrófagos cultivados en presencia de NPETn. Bajo objetivo 40X. -----	31
Figura 21. Imágenes de confocal de macrófagos en presencia de NPETn y NPETd. El color azul (DAPI) corresponde al núcleo celular, color verde (citoesqueleto) corresponde a la actina y color rojo (Rojo Nilo) corresponde a NPET.-----	33
Figura 22. Densidad óptica de cultivos microalgales en presencia y ausencia de NPETd. Los datos representados son el valor promedio de 3 ensayos independientes. -----	34
Figura 23. Graficas obtenidas por citometría de flujo, en el cual se observan los cuadrantes delimitados para la determinación de las células vivas (R1) y "células muertas" (R2, R3 y R5). -----	35
Figura 24. Graficas de los cultivos microalgales en presencia y ausencia de NPETd, analizados por citometría de flujo.-----	36
Figura 25. Microalga Isochrysis Galbana en presencia de NPETd mediante microscopía confocal. La señal verde corresponde a detectar la clorofila de microalga. La señal en rojo corresponde a detectar marcaje de mitocondria y NPETd teñidos de RN.-----	38

ABREVIATURAS

NP	Nanoplásticos
MP	Microplásticos
PET	Tereftalato de polietileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloruro de vinilo
PE	Polietileno
NPET	Nanopartículas de Tereftalato de polietileno.
NPETn	Nanopartículas de PET obtenidas por trituración con Nitrógeno
NPETd	Nanopartículas de PET obtenidas por disolución de ácido
ISO	Isochrysis Galbana
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	dimetilsulfóxido
SFB	suero fetal bovino
PBS	solución buffer fosfato salina
TFA	Ácido tricloroacético
RN	Rojo Nilo

RESUMEN

En la actualidad es difícil imaginar el día a día sin plásticos de un solo uso, especialmente de empaquetamiento, a pesar de los esfuerzos por dar una segunda vida útil, los plásticos de un solo uso que no son adecuadamente desechados terminan siendo arrastrados a cuerpos de agua naturales, donde debido a las variables ambientales se produce la formación de micro/nano plásticos, los cuales pueden afectar a la flora y fauna.

En el presente trabajo de tesis, el propósito primordial fue la observación del comportamiento y efecto del polímero plástico tereftalato de polietileno en dimensiones nanométricas en dos sistemas *in vitro*. El proyecto se dividió en tres etapas principales:

La primera etapa consistió en la obtención de nanopartículas de tereftalato de polietileno partir de botellas para envasado de agua utilizando dos métodos, ambos protocolos diseñados en el laboratorio por la Dra. Ana Guadalupe Rodríguez. El primero constó de trituración mecánica por nitrógeno líquido y el segundo consistió de una disolución del plástico en ácido trifluoroacético (TFA).

En la segunda etapa, para conocer su morfología y diámetro hidrodinámico, las NPET fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía de luz dinámica (DLS), respectivamente. Sus propiedades fisicoquímicas se analizaron por difracción de rayos X (XRD), análisis termo-gravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), siendo comparadas con PET sin tratamiento.

Por último, en la tercera parte, se realizó la evaluación toxicológica de las NPET en dos sistemas *in vitro*; el primer sistema se trabajó con la línea celular de macrófagos (RAWBLUE) y el segundo en microalgas *Isochrysis Galbana*. Las células macrófago en presencia de NPET fueron evaluadas su viabilidad y proliferación, por ensayo de Alamar blue y su concentración de nitritos para analizar su actividad fagocitosa, bajo distintas concentraciones entre 10 mg/mL–10 ng/mL de partículas de PET. Para las microalgas se evaluó la viabilidad y proliferación a partir de su densidad óptica y por citometría de flujo.

Ambos sistemas *in vitro* fueron evaluados con microscopía confocal, donde las NPET fueron teñidas con el colorante fluorescente Rojo Nilo, para dar un seguimiento, bajo microscopía confocal y microscopía de contraste de fases y fluorescencia

Palabras clave: Nanoplásticos, tereftalato de polietileno, microalgas, macrófagos.

ABSTRACT

Nowadays it is difficult to imagine daily life without single-use plastics, especially packaging plastics, and despite efforts to give them a second useful life, single-use plastics that are not properly disposed of end up being washed into natural bodies of water, where due to environmental variables the formation of micro/nano plastics occurs, which can affect flora and fauna.

In the present thesis work, the primary purpose was to observe the behavior and effect of the plastic polymer polyethylene terephthalate in nanometric dimensions in two *in vitro* systems. The project was divided into three main stages:

The first stage consisted of obtaining polyethylene terephthalate (PET) nanoparticles from water bottles using two methods, both protocols designed in the laboratory by Dr. Ana Guadalupe Rodríguez. The first consisted of mechanical grinding by liquid nitrogen and the second consisted of dissolving the plastic in trifluoroacetic acid (TFA).

In the second stage, to know their morphology and hydrodynamic diameter, the nanoparticles of PET were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light spectroscopy (DLS), respectively. Their physicochemical properties were analyzed by X-ray diffraction (XRD), thermo-gravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), and compared with untreated PET.

Finally, the third stage, the toxicological evaluation for nanoparticles of PET was carried out in two *in vitro* systems; the first system worked with the macrophage cell line (RAWBLUE) and the second in *Isochrysis Galbana* microalgae. The macrophage cells in the presence of nanoparticles of PET were evaluated for their viability and proliferation, by Alamar blue assay and their nitrite concentration to analyze their phagocytic activity, under different concentrations between 10 mg/mL-10 ng/mL of PET particles. For microalgae, viability and proliferation were evaluated from their optical density and by flow cytometry.

Both *in vitro* systems were evaluated with confocal microscopy, where the nanoparticles of PET were stained with the fluorescent dye Nile Red to follow up under confocal microscopy and phase contrast and fluorescence microscopy.

Keys words: Nano plastics, polyethylene terephthalate, microalgae, macrophage

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PLÁSTICO.

Desde su impulso comercial en las décadas 30's y 40's, especialmente en el sector de empaquetamiento, el plástico ha tenido un crecimiento global dominante. Los plásticos, han cambiado el estilo de vida de la población en general, obteniendo, en sus principios, una respuesta positiva por parte de sociedad, debido a que, representada una alternativa segura para el uso de los niños, mayor facilidad y seguridad para transportar objetos o productos e higiénico, además de ser un material versátil, moldeable, ligero y de bajo costo. (Thompson et al., 2009)

Los plásticos son polímeros orgánicos, que puede ser sintético o semisintético, debido a la polimerización de monómeros derivados, mayormente, de petroquímicos. Su denominación de plástico, hace referencia a propiedad de plasticidad, la cual es su habilidad de deformarse sin quebrarse. Los plásticos se dividen en dos tipos: termoestables y termoplásticos. En los termoestables, cuando se solidifican, su forma es permanente, son amorfos y se considera que tienen un peso molecular infinito. En cuanto a los termoplásticos, a diferencia de los termoestables, pueden ser moldeados por medio del calor y en algunos casos. Los termoplásticos cuentan con estructuras amorfas o parcialmente cristalinas, con pesos moleculares entre 20,000-500,000 amu (unidades de masa atómica). (Helmestine, 2018 & Thompson, 2009)

1.2 CRECIMIENTO E IMPACTO AMBIENTAL.

En 1950, un par de décadas después de su lanzamiento comercial, el plástico empezó a revolucionar el estilo de vida de la población civil y la manufactura industrial, la producción global era 2 millones de toneladas por año. Para 2015, la producción se incrementó casi 200 veces, llegando a 381 millones de toneladas. En la figura 1 se observa el crecimiento exponencial de la producción de plásticos a lo largo de este tiempo. (Geyer et al., 2017)

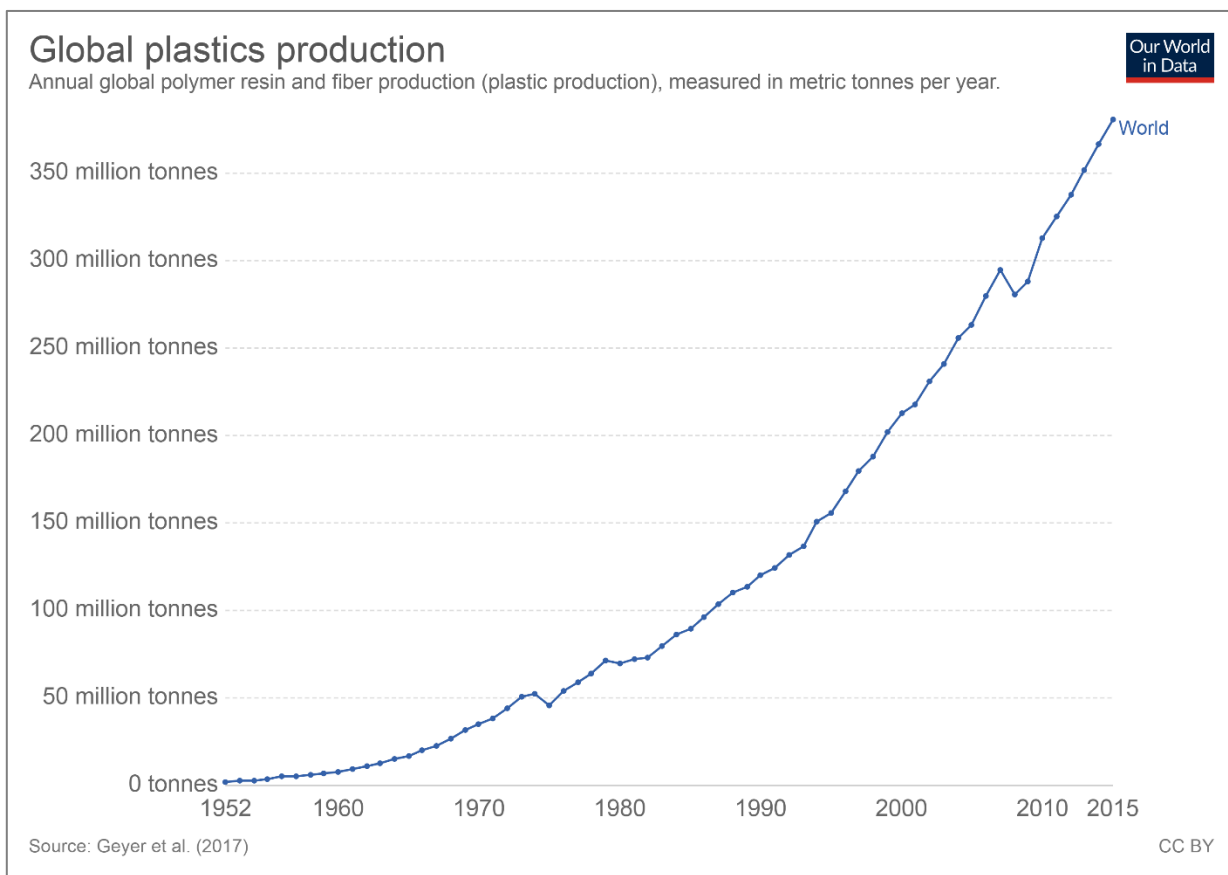


Figura 1. Producción global de resina polimérica y fibra (producción de plástico), medida en toneladas métrica. Grafica obtenida de <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>

Los plásticos se han aplicado a diferentes sectores de producción en los cuales se encuentra empaquetamiento, construcción, textiles, transportación, electrónica, maquinaria industrial, productos de consumo e institucionales, entre otros. Sin embargo, el crecimiento exponencial que ha tenido en las últimas décadas ha repercutido gravemente en el ambiente, debido a la cantidad de desperdicio que se genera cada año. En 2010 se estimó que la cantidad de desperdicios sólidos plásticos, en 192 países costeros (93% de la población mundial), fue de aproximadamente 11% (275 millones de toneladas métricas). (Jambeck et al., 2015)

En la actualidad es difícil imaginar el día a día sin plásticos de un solo uso, encontrándose desde botellas de bebida, contenedores de comida, bolsas, etc. Siendo en 2015 el empaquetamiento el sector dominante, con una producción de 146 millones de toneladas por año y al mismo tiempo, el que genera mayor cantidad de desperdicios por año. (Geyer et al., 2017)

En 2018, la demanda de los plásticos para empaquetamiento, excedía la cantidad de 2.2 trillones de unidades (Downey, 2019). Aunque los esfuerzos por dar una segunda vida útil a la basura plástica han incrementado en las últimas dos décadas, el reciclaje de estos sigue conformando menos del 30% de lo que es producido por año. Al resto de los plásticos de un solo uso que no son adecuadamente desechados podrían terminar siendo arrastrados a los cuerpos de agua naturales, donde afectarán a la flora y fauna e introduciéndose en la cadena trófica.

1.3 MICRO/NANO PLÁSTICOS.

Los micro/nanoplásticos han sido definidos en distintas maneras. Los microplásticos (MP), son los plásticos que se encuentren dentro de las dimensiones de 0.1 μm -5mm, mientras que los nanoplásticos (NP) son aquellos con dimensiones <0.1 μm . (Alimi et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Gigault et al., 2018; Koelmans et al., 2015)

Los MP y NP pueden encontrarse a partir de un origen primario o secundario, en el primario los plásticos se encuentran de forma intencional con las dimensiones micro/nanométricas dentro del producto, como pueden ser en productos de higiene y belleza; en el secundario provienen de la degradación de plásticos de mayor tamaño (Ferreira et al., 2019). En este trabajo, nos concentraremos en la segunda categoría.

Los MP/NP secundarios se forman como consecuencia de una lenta y constante degradación debido a las variables ambientales, como son fotodegradación UV, abrasión mecánica, biodegradación, hidrólisis, la inestabilidad material y condiciones químicas y físicas. (Andrady, 2011; Ioakeimidis et al., 2016)

En la actualidad ha crecido la preocupación por los MP/NP y sus posibles efectos al introducirse en el ecosistema, la cadena trófica y la salud pública. Debido a su tamaño y la inherente dificultad para identificarlos y aislarlos, no se tiene una referencia de la cantidad exacta que pueda estar depositado en los océanos. Sin embargo, a partir de simulaciones se puede estimar que, del peso total de plástico en la superficie oceánica, aproximadamente el 13.8% corresponde a MP y 2.5% a NP. (Koelmans et al., 2017)

La ubicuidad de los plásticos, en especial su presencia en muy diversos ambientes como MP y NP, implica que muchos organismos puedan estar en contacto directo con estos materiales e incluso puedan ser ingeridos por estos. Existe una preocupación global de lo que esto implica, se estima que los MP y NP pueden incorporarse a la cadena trófica y de esta forma llegar al ser humano por ingesta, ya sea directa o indirecta.

Recientemente se han encontrado MP de 5-10 μm de tamaño en placenta humana, tanto en el lado materno como en el fetal, entre los cuales estaba el PET. De acuerdo con los autores, es posible el transporte de los MP por la vía sanguínea, esto debido a sus dimensiones, sin embargo, se desconoce si la vía de entrada sería aérea o digestiva. (Ragusa et al., 2021)

Esta evidencia, abre la puerta a otras preguntas, por un lado, deja la incógnita de la vía de ingreso, siendo la digestiva, una de las que más preocupantes, por otro lado, surge la duda sobre el alcance que pueden tener los NP debido a sus dimensiones. La presencia de los MP/NP en diferentes ecosistemas se respalda con la evidencia de que estos pueden ser transmitidos entre especies, debido a que se han encontrado microplásticos en diferentes alimentos, en especial los de origen marino. (Barboza et al., 2018; Karami et al., 2017; Kosuth et al., 2018)

Actualmente, a pesar de la creciente preocupación de los MP/NP, los estudios en referencia siguen estando en desarrollo y limitados por el tipo de polímeros que son estudiados, siendo usado principalmente el poliestireno (PS), debido a su disponibilidad comercial.

Para este trabajo de tesis se realizará un trabajo enfocado especialmente en el tereftalato de polietileno, el cual es uno de los polímeros del que no se encuentra mucha literatura de sus efectos, además de ser el de mayor producción para uso de empaquetamiento de un sólo uso.

1.4 TEREFTALATO DE POLIETILENO.

El tereftalato polietileno (PET), es uno de los plásticos más populares en la actualidad debido a su uso y abundancia comercial, siendo de los principales plásticos de un solo uso; es producido a partir de la polimerización de etilenglicol y ácido tereftálico. La estructura del polímero (Figura 2) cuenta con la presencia de grandes anillos, la cual le otorga propiedades tales como gran rigidez y resistencia, especialmente cuando las cadenas se encuentran alineadas entre sí. (Britannica, 2020)

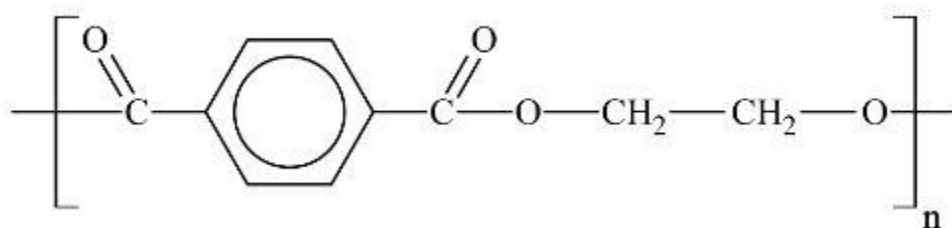


Figura 2. Estructura general del monómero de tereftalato de polietileno.

La producción de PET está principalmente dirigida al área empaquetamiento en forma de botellas de un solo uso, para almacenamiento de agua de bebidas. Su uso se ha considerado como una forma fácil, práctica y ligera para transportar bebidas, además de ser de bajo costo. La cantidad de producción de las botellas de este polímero se ha visto incrementada exponencialmente en los últimos años.

1.5 MICROALGAS.

El termino microalga no es taxonómicamente correcto; sin embargo, son coloquialmente llamados así los microorganismos autótrofos, que tiene una importancia ecológica fundamental en el océano, que se encuentran dispersos en la columna de agua del mar y cuya distribución está en función de la dinámica oceánica. Nos referimos específicamente al fitoplancton, que incluye también a organismos micro flagelados y microciliados auxótrofos. (Gómez Luna, 2007)

Las microalgas se pueden definir como microorganismos algales que cuentan con clorofila α , capaces de realizar fotosíntesis oxigénica y fijación de CO_2 , asimilar nitratos, nitritos y fosfatos (NO_2 , NO_3 y PO_4) (Abalde Alonso et al., 1995). Dentro del área de acuicultura las microalgas tienen un rol clave como factor nutritivo ya que son el soporte trófico en cultivos de diversos organismos

filtradores como moluscos bivalvos o para cultivo larvario de peces marinos (Cañavate, 2011). En la Figura 3, se muestra un ejemplo de la cadena alimenticia marina, siendo el fitoplancton la base y se conoce como productor primario. (Marina et al 2019)

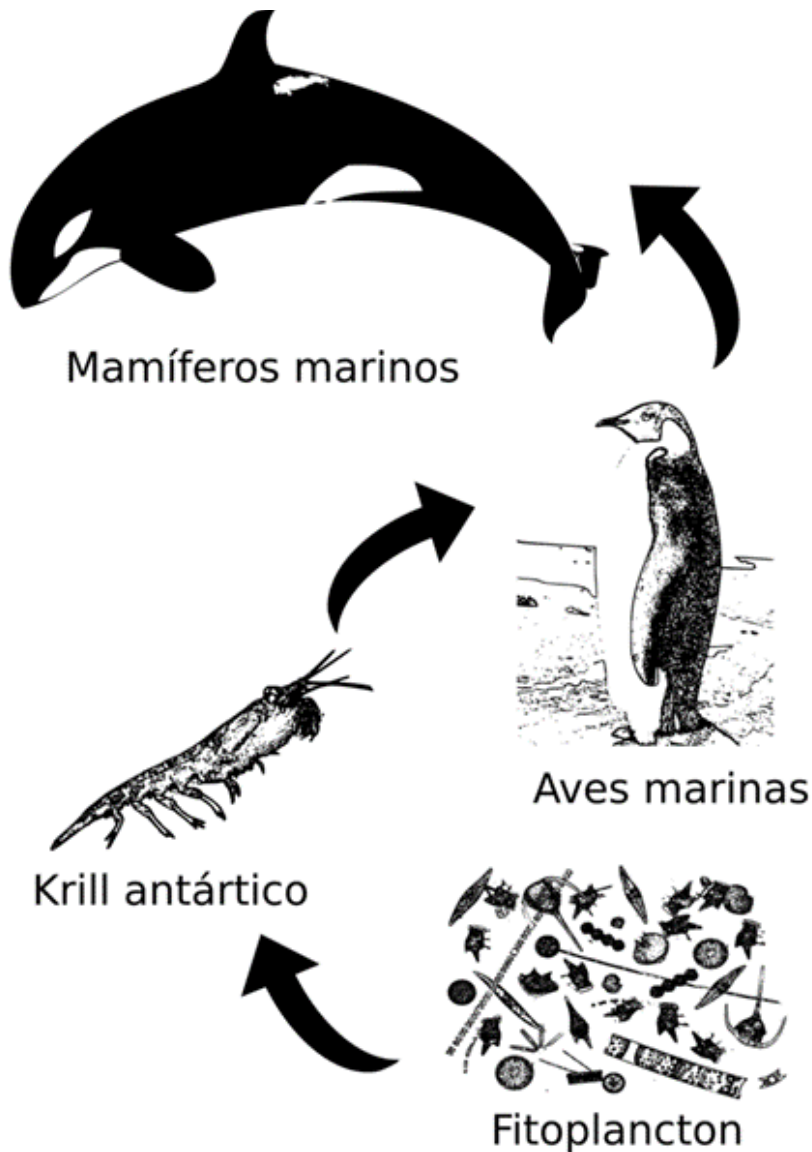


Figura 3. Ejemplo de cadena alimenticia marina, en el cual, el fitoplancton es la base y se conoce como productor primario.

Una de las microalgas usadas en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC), es *Isochrysis galbana*, una especie que pertenece al phylum *Haptophyta*. Estas células presentan un color pardo (oro-amarillo) vistas bajo el microscopio óptico (Figura 4), tienen una forma elipsoidal, con dimensiones entre 5-6 μm de largo, 2-4 μm de ancho y 2.5-3 μm de grosor, cuentan con dos flagelos lisos de $\sim 7 \mu\text{m}$ de largo con los cuales pueden desplazarse (Thronsdén, 1997). Se caracterizan por tener una estructura adicional parecida a un tercer flagelo llamado haptoneuma, y no cuentan con una pared celular, en su lugar presentan una membrana plasmática. Es una especie solitaria, es decir, no forma colonias y su

reproducción es por división longitudinal, se ha registrado que puede dividirse más de una vez en 5 horas, sobresaliendo entre otras especies por elevados valores de crecimiento (Parke, 1949). Los pigmentos característicos de esta especie son la clorofila a (en mayor concentración) y clorofila c, se ha descrito ampliamente que cuenta con altos valores de proteínas (26 – 47,2 %) y lípidos principalmente ácido graso docosahexanoico (DHA). (Velasco et al., 2009)

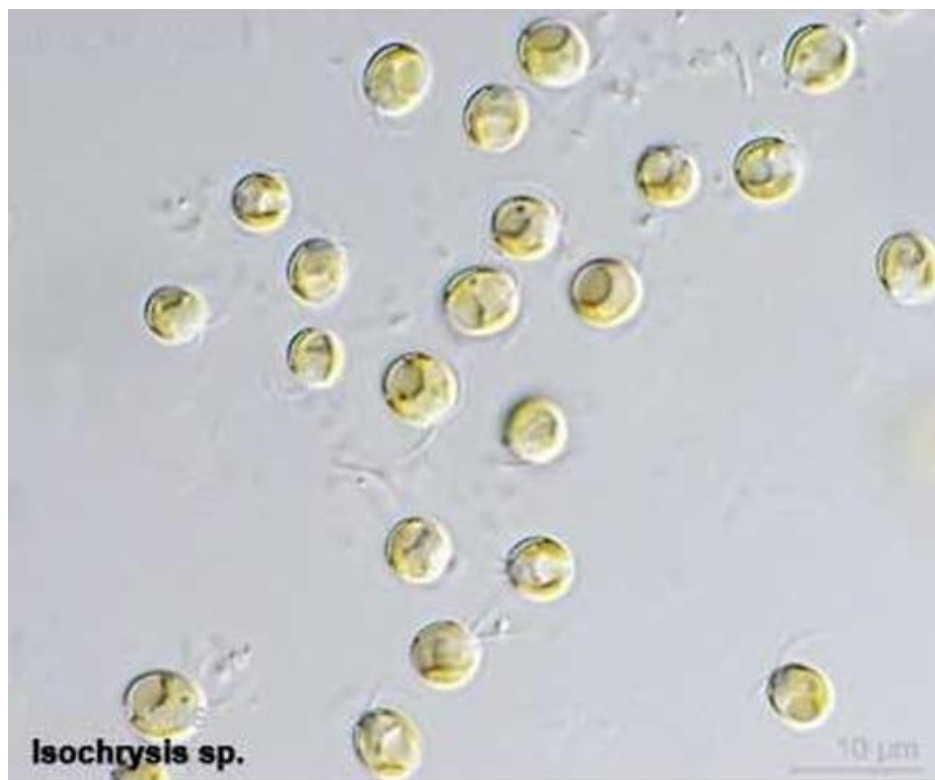


Figura 4. Micrografía de *Isochrysis galbana*. Obtenida de <https://algaeresearchsupply.com/pages/isochrysis>.

1.6 MACRÓFAGOS.

El cuerpo humano cuenta con el sistema inmune como defensa en contra de agentes infecciosos y organismos invasores. El sistema inmune innato, es con el cual se nace y actúa como la primera línea de defensa ante los patógenos y agentes extraños (incluidos materiales sintéticos) que entran al organismo. Los macrófagos actúan como el componente clave, siendo esenciales en la defensa u homeostasis del huésped, siendo células inmunes fagocíticas conservadas evolutivamente. Son células centinelas que se encuentran por todo el cuerpo y cuentan con características únicas según el origen y tejido donde residan, se encargan de detectar signos de agresión, por agentes infecciosos o amenazas endógenas, desarrollan una rápida e intensa respuesta transcripcional, pero transitoria.

Los macrófagos son células versátiles y componentes clave en la respuesta inmune innata, con una plasticidad y diversidad funcional, que responden a las diferentes señales micro ambientales en los tejidos, por la polarización de los distintos fenotipos, dependiendo de las funciones propias que requiera el tejido (Figura 5). Participan en la respuesta inmune adquirida y son esenciales en los

mecanismos de defensa y en los procesos de homeostasis, activan y participan en procesos inflamatorios, pueden interactuar con antígenos desarrollando un mecanismo microbicida. En el caso de patologías crónicas como el cáncer, desarrollan mecanismos tumorigénicos o promoviendo la reparación de los tejidos como el cerebro, glándulas mamarias y huesos; asociada a la función fagocítica que contribuye al proceso de desarrollo y regeneración de muchos órganos. (Ziegler-Heitbrock, 2014)

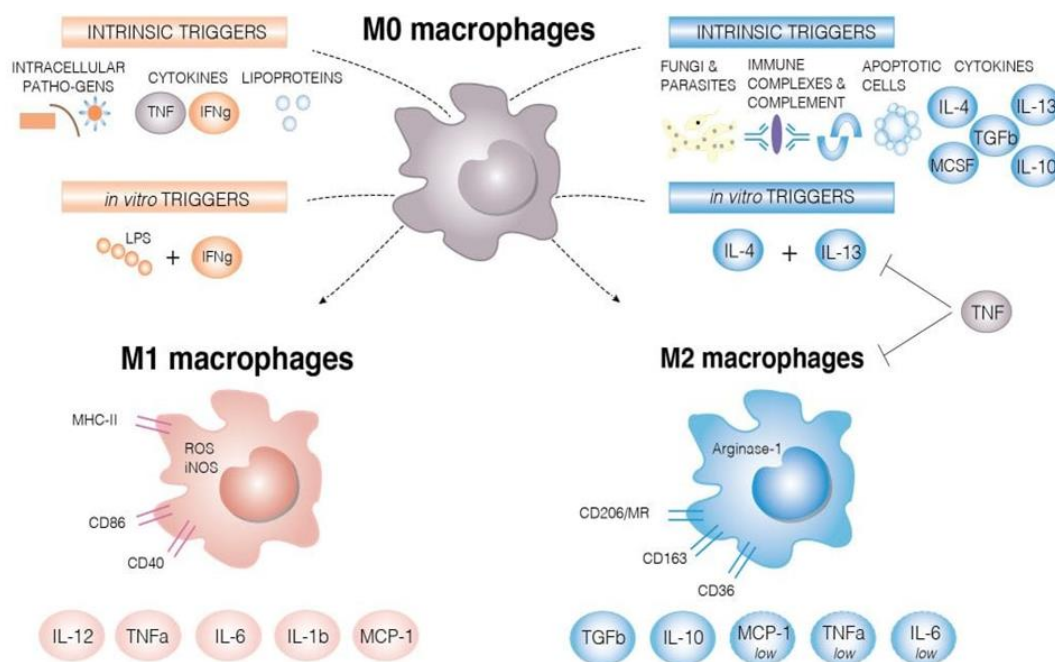


Figura 5. Principales estados de polarización de los macrófagos. (Obtenida de <https://www.promab.com/macrophage-polarization-assay>).

2 ANTECEDENTES

Al ser un área emergente de investigación, existen pocos estudios acerca de los efectos toxicológicos de los nanoplásticos. Entre algunos de los estudios que se han hecho, se han encontrado efectos en el crecimiento celular de proteobacterias. Inhibición en las tasas de crecimiento y reducción de la densidad celular de microalgas verdes unicelulares. Mejillón comestible expuesto a MP/NP fue reconocido como un alimento no nutritivo o de bajo contenido nutricional. Especies de crustáceos que fueron expuestos a nanoplásticos, vieron afectada su velocidad de nado y se observó que estos sufrieron de una acumulación de nanoplásticos en los intestinos (Bergami et al., 2017; Gambardella et al., 2017; Sjollem et al., 2016; Sun et al., 2018; Wegner et al., 2012). En todos los estudios anteriores, se observó que tienen un punto en común, y es que fueron evaluadas a partir de partículas de PS comercial, el cual es uno de los plásticos mayormente estudiados por sus efectos para este tipo de investigaciones, además que, las partículas analizadas fueron manufacturadas en dimensiones micro/nano. Por lo tanto, se puede considerar que estas micro/nanopartículas plásticas, no representan, un escenario real debido a que, además del PS, existen otros plásticos que forman parte de la contaminación por micro/nanoplásticos, tales como el PE, PVC o el PET.

Uno de los primeros trabajos en evaluar el PET como nanoplásticos contaminante, fue presentado por Magrì y colaboradores, quienes vieron el efecto de las nanopartículas de PET en una línea celular epitelial humana (Magrì et al., 2018). En sus observaciones corroboraron que estas podían atravesar fácilmente la membrana celular internalizando a estos nanoplásticos. Sin embargo, para este estudio, el método mediante el cual obtuvieron nanopartículas fue por ablación láser. Este método, aunque permite obtener partículas de aproximadamente 100 nm, la cantidad obtenida reportó rendimientos o cantidades muy bajas, además de ser un proceso de difícil reproducción y de alto costo, haciéndolo poco accesible para realizar investigación en el área.

Otra alternativa de obtención de NPET fue diseñada por Rodríguez y colaboradores, en la cual por medio de una disolución y precipitación ácida con ácido tricloroacético (TFA), se pueden obtener NPET con dimensiones de entre 50 y 200 nm. Esta última será una de las metodologías utilizadas para el presente trabajo. (Rodríguez-Hernández et al., 2019)

3 JUSTIFICACIÓN

El impacto económico de los plásticos, ha provocado una mayor dependencia de estos en nuestra sociedad, debido a sus múltiples beneficios, ocasionando un aumento en su producción anual, lo cual conlleva a un incremento en desechos y contaminación del ambiente, afectando mayormente a cuerpos de agua y organismos que ahí habiten. La presencia de estos desechos ha provocado la presencia y acumulación de lo que hoy se conoce como micro/nanoplásticos, generando una preocupación a nivel global por los posibles impactos en los ecosistemas y como consecuencia en la salud pública.

El PET es uno de los plásticos más producidos y dispersados en el ambiente, el cual representa un potencial peligro ambiental. En este trabajo se estudiaron dos modelos *in vitro* para estudiar, el efecto de las NPET: usando una línea celular de macrófagos, cuya función principal es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo; y en una especie de microalga, la cual es usada como alimento en diversos cultivos de organismos acuáticos de consumo humano.

4 HIPÓTESIS

Las nanopartículas de PET afectarán la respuesta celular en los macrófagos murinos RAWBLUE y en las microalgas *Isochrysis Galbana*, ocasionando alteraciones en la viabilidad y proliferación.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de NPET en modelos *in vitro* en una línea celular de macrófagos y una especie de microalga.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtención de nanopartículas de tereftalato de polietileno.
- Caracterización de propiedades de nanopartículas obtenidas por TEM, DLS, XRD, TGA Y DSC.
- Analizar el efecto citotóxico en ensayos *in vitro* en macrófagos murinos RAWBLUE.
- Analizar el efecto citotóxico en ensayos *in vitro* en especie de microalga *Isochrysis Galbana*.

6 METODOLOGÍA

La realización de este proyecto se encuentra dividida en tres etapas, la primera consiste en la obtención de NPET, los cuales se preparan a partir de dos diferentes métodos, el primero por trituración mecánica y el segundo por disolución ácida, ambos a partir de los protocolos de la Dra. Ana Rodríguez. En la segunda parte, se caracterizarán las NPET de ambos métodos. Por último, se llevará a cabo la evaluación toxicológica en presencia de NPET, en la línea celular RAWBLUE y, en las microalgas *Isochrysis Galbana*, siendo este último evaluado solo con las NPET obtenidas por el método de disolución ácida.

6.1 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PET (PRIMERA ETAPA).

El PET utilizado para obtener las nanopartículas, en ambas metodologías, se obtuvo a partir de fondos de botellas de agua potable de un solo uso, las cuales fueron lavadas repetidas veces con agua y jabón, para asegurar su limpieza, previo a su proceso de trituración.

6.1.1 Obtención por trituración mecánica.

El proceso para la obtención de las nanopartículas se llevó a cabo de la siguiente manera: Una vez limpiadas las botellas, la base (parte más gruesa) fue separada del resto de la botella por medio de tijeras. Posteriormente, con ayuda de una sierra dentada de acero inoxidable, se obtuvo viruta de forma manual. Las partículas obtenidas fueron refinadas por medio de un tamiz No. 70 con un tamaño de apertura de 220 μm (mesh No. 35, Cole-Parmer Testing Sieve). Una vez separadas, fueron lavadas en una solución al 70% de etanol y centrifugadas a 3,500 rpm por 30 minutos para eliminar el alcohol. Finalmente, se colocaron en un mortero de porcelana, al cual se le agregó el suficiente nitrógeno líquido para cubrir la viruta, y se pulverizó manualmente hasta obtener un polvo más fino, resultando una parte de esta muestra en las nanopartículas de PET, este tipo de partículas serán referidas como NPETn.

6.1.2 Obtención por disolución ácida.

Para la obtención de NPET por disolución ácida, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente hasta el proceso de tamizado con malla de 220 μm . Para el proceso de dilución y precipitación con ácidos se utilizó un gramo de estas partículas de PET, las cuales fueron completamente disueltas en 10 mL de solución concentrada de ácido trifluoroacético (TFA) (90% v/v) a una temperatura de 50° C en constante agitación (aprox. 2 horas). Después de disuelto, la solución se deja toda la noche. Para precipitar las micro/nanopartículas, se agregó a la solución inicial, 10 mL de una solución acuosa de ácido trifluoroacético (20% v/v) y se mantuvo en agitación constante por 2 horas.

La suspensión obtenida se centrifugó a 3,500 rpm por una hora y se deshecho el sobrenadante. El pellet (la parte sólida precipitada) es resuspendido en 100 mL de agua Milli-Q y ultrasonificado a 25% de amplitud por espacio de 1 minuto, con intervalos de 10 segundos sonicación/descanso (Ultrasonic homogenizer sound arrest YM-1000Y a 220 V). Después la muestra de

micro/nanopartículas se dejó reposar en una probeta de 1 L, agregándose 100 mL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 5% y aforándose con agua Milli-Q®. La probeta fue cubierta con papel Parafilm y agitada vigorosamente, se dejó durante 24 horas para promover la sedimentación y separación de las nanopartículas, se recupera el volumen en el cual se encuentren las NPET menores a los 200 nm, previo a la medición con el Nanosizer (Malvern), este tipo de partículas serán referidas como NPETd.

6.2 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS (SEGUNDA ETAPA).

6.2.1 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para la observación por TEM, de la muestra de NPETn, 5 mg se disolvieron en 1 mL de etanol absoluto, se colocaron en un agitador de vórtice y se dejaron sedimentar por 1 minuto para separar las partículas más grandes; posteriormente se tomó una alícuota de la parte superior de la solución y se colocó en una rejilla para TEM. Para la muestra de NPETd, se disolvieron 5 mg en 1 mL de etanol absoluto y se tomó inmediatamente la alícuota para ser colocada en la rejilla de TEM. Para ambos casos, se colocaron 10 μ L de solución sobre una rejilla para TEM de cobre (Support films carbon Type-B 300 mesh), se dejaron secar a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, modelo JEM-2010, operado A 100 keV, obteniéndose imágenes de campo claro y alta resolución.

6.2.2 Espectroscopía de luz dinámica (DLS).

Se llevaron a cabo mediciones por espectroscopía de luz dinámica a temperatura ambiente, en Zetasizer modelo Nano ZS, marca Malvern, para determinar diámetro hidrodinámico de las NPETn y NPETd. Para lo cual, se realizó una solución de NPETn y NPETd con una concentración aproximada de 1 μ L/mL. Los parámetros establecidos fueron, temperatura ambiente, H₂O como medio dispersante y material analizado como poliestireno, debido a que sus características ópticas son similares con el PET, por ambos ser materiales poliéster, además de que el poliestireno tiene estas características mejor estudiadas bajo espectroscopía de luz dinámica.

6.2.3 Difracción de rayos X (XRD).

En este trabajo se analizaron muestras de NPETd y NPETn, junto con una muestra control de PET; en el difractómetro de rayos X modelo D2 Phaser, marca Bruker™. Los parámetros para determinar la estructura cristalina fueron en un ángulo 2θ de 10° a 80°, con un Incremento de 0.02° y captura de datos de 0.2 segundos. Para determinar la estructura cristalina de ambos materiales, el difractograma resultante fue comparado con la tabla cristalográfica 00-060-0989 (Figura 6). (Blanton, 2009)

A)

Peak list							
No.	h	k	l	d [Å]	2θ [°]	I [%]	
1	0	-1	1	5.48480	16.147	77.0	
2	0	1	0	5.08792	17.416	79.0	
3	-1	0	2	4.10854	21.612	65.0	
4	-1	0	1	4.10854	21.612	65.0	
5	1	-1	0	3.91044	22.721	85.0	
6	-1	0	3	3.42576	25.989	100.0	
7	1	0	0	3.42576	25.989	100.0	
8	1	-1	1	3.21706	27.707	39.0	
9	0	-2	1	2.75003	32.533	17.0	
10	1	1	-3	2.75003	32.533	17.0	
11	1	0	-5	2.13134	42.374	17.0	
12	2	0	-4	2.04558	44.242	8.0	
13	1	2	-2	1.94585	46.640	11.0	
14	0	3	-2	1.83757	49.567	8.0	
15	2	-3	0	1.72836	52.934	6.0	

B)

Name and formula		Crystallographic parameters	
Reference code:	00-060-0989	Crystal system:	Anorthic
Compound name:	Polyethylene terephthalate	Space group:	P-1
PDF index name:	Polyethylene terephthalate	Space group number:	2
Empirical formula:	$C_{10}H_8O_4$	a (Å):	4.5610
Chemical formula:	$(C_{10}H_8O_4)_n$	b (Å):	5.9700
		c (Å):	10.8400
		Alpha (°):	98.3000
		Beta (°):	118.5000
		Gamma (°):	112.4500
		Calculated density (g/cm ³):	1.45
		Volume of cell (10 ⁶ pm ³):	219.50
		Z:	1.00
		RIR::	-

C)

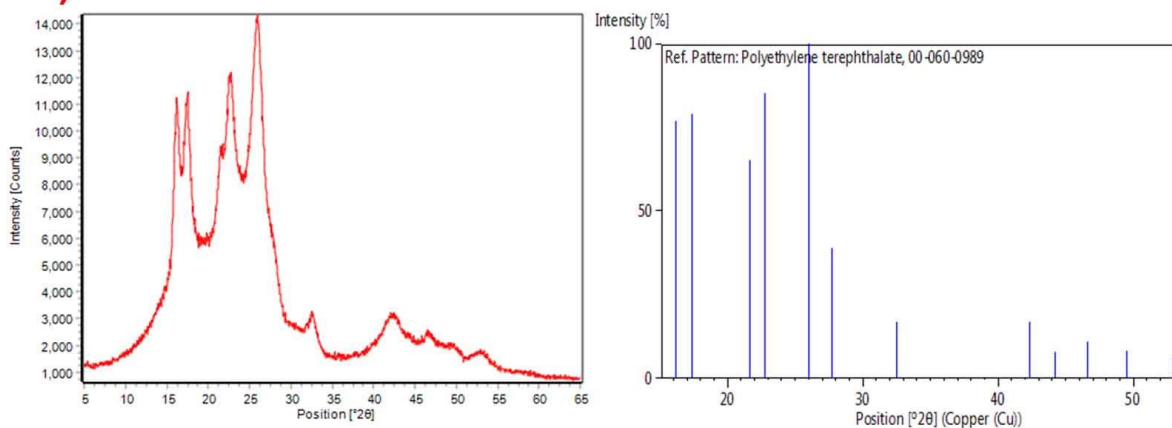


Figura 6. A) Tabla cristalográfica 00-060-0989, B) Parámetros de red del tereftalato de polietileno y C) patrón de rayos X característico del material.

6.2.4 Análisis Termo-gravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido (TGA y DSC).

El análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial se realizó en un analizador marca TA Instruments, modelo SDT Q600. Se analizó 5 mg. de cada una de las muestras de NPETd y NPETn obtenidas de ambas metodologías, junto con una placa de plástico de PET de una botella como muestra control. Se utilizó una razón de calentamiento de 10 °C/min, en un intervalo de temperatura de 50 °C a 600 °C, bajo un flujo de aire seco de 100 mL/min.

6.3 EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA (TERCERA ETAPA).

6.3.1 Marcaje fluorescente de nanopartículas.

Para marcar las muestras de PET y darles seguimiento visual en los ensayos con células, fue utilizado el colorante fluorescente Rojo Nilo (RN), el cual ha demostrado nula toxicidad celular y ha sido ampliamente utilizado para la identificación de lípidos en muestras biológicas (Maes et al., 2017).

El primer paso fue preparar la solución de RN, a partir de 0.5 mg de colorante Rojo Nilo en polvo diluida en 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Para la tinción, se suspendieron 10 mg de NPET en 1mL de etanol absoluto y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 25 minutos, como método de limpieza, siendo el sobrenadante desechado. Las NPET se resuspendieron en 1 mL de agua Mili-Q y se añadió 200 µL de solución RN. La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en agitación constante por 24 horas en oscuridad. Pasado el tiempo, la muestra fue centrifugada a 14,000 rpm por espacio de 30 minutos y se desechó el sobrenadante. Para eliminar todo el RN excedente, fueron realizados tres lavados por centrifugación (14,000 rpm), uno con etanol al 70% y dos con solución buffer fosfato salina al 0.1 M (PBS 1X) a pH 7.4.

Para el uso de las NPET fluorescentes en cultivo celular, estas fueron suspendidas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) de Sigma Aldrich®, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) de Biowest® y 1% de antibiótico - antimicótico (penicilina/estreptomicina y anfotericina B) de Sigma Aldrich®.

6.3.2 Ensayo de cultivo de células macrófago RAWBLUE.

La línea celular utilizada para el siguiente proyecto fue células macrófago RAWBLUE, derivadas de macrófagos murinos RAW 264.7, con integración cromosómica de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF-κB y AP-1. Además, expresa muchos receptores de patrones de reconocimiento (PRRs), incluyendo receptores toll (TLRs), receptores NOD (NLRs), receptores RIG-I (RLRs) y receptores de lectina tipo C (CLRs), (Invivogen data sheet). Las células fueron mantenidas y cultivadas a 37 °C en atmósfera al 5 % de CO₂. Se utilizó el medio de cultivo recomendado para estas células, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) de Sigma Aldrich®, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) de Biowest® y 1 % de antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomicina y anfotericina B) Sigma Aldrich®. A este medio se le denominó DMEM completo.

6.3.2.1 *Conteo celular.*

Para cada uno de los ensayos las células fueron contadas a partir del protocolo del laboratorio. Para realizar el conteo de células RAWBlue se utiliza una cámara Neubauer, la cual consiste en una gruesa capa de vidrio, del tamaño de un portaobjetos, con unas plataformas centrales que son exactamente 0.1 mm más bajas que las laterales.

El medio de cultivo donde se encuentran las células es desechado, nuevo medio de cultivo es agregado en una cantidad $n+1$ mL, siendo n el valor del volumen recién desechado. Las células son removidas con scrapper, traspasados a tubos falcon y resuspendidos. En la cámara se coloca un cubre objetos y se extraen 10 μ L del medio de cultivo con las células y se colocan en la cámara Neubauer. La cámara se observa bajo microscopio óptico y se cuentan las células de cada cuadrante, parecido a la Figura 7, para después obtener un promedio.

$$\bar{X} = \frac{A_1 + A_2 + A_3 + A_4}{4} \quad \vdots$$

$$\text{Numero de células} = \bar{X} \cdot (10^4) \cdot (\text{Volumen})$$

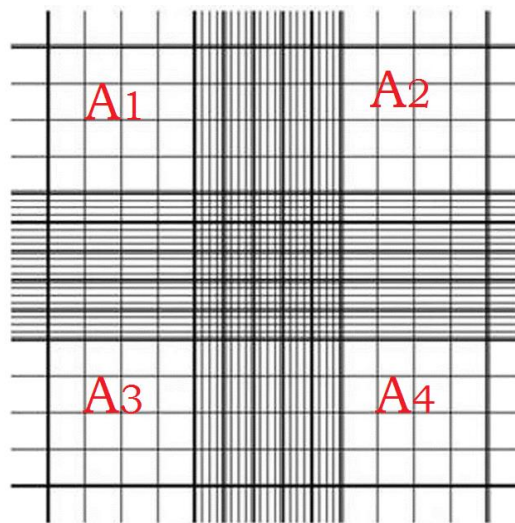


Figura 7. Esquema de cámara Neubauer.

6.3.2.2 *Viabilidad y proliferación.*

Para determinar de viabilidad y proliferación de las células RAWBlue en presencia de NPETd y NPETn se llevó a cabo un ensayo rutinario colorimétrico de viabilidad celular, utilizando el reactivo Alamar Blue (sigma Aldrich). El Alamar Blue es un reactivo listo para usarse a base de resazurina, rápido, conveniente, es un indicador azul permeable a las células, no tóxico y débilmente fluorescente, tiene una amplia aplicabilidad y se puede usar con varias líneas celulares humanas y animales, bacterias, plantas y hongos.

Para este ensayo, primero se hicieron diluciones seriadas (1:10) de NPETn y NPETd en medio completo, partiendo de una solución stock. Como primer experimento, la solución stock de NPETn inicio en una concentración de 0.1 mg/mL, a partir de este experimento, se rediseño que para las NPETd iniciara a partir de 10 mg/mL. Una vez obtenidas las diluciones, 10,000 las células RAWBlue fueron sembradas en una placa de 96 pozos, por triplicado para cada concentración de NPET junto con dos controles; un control negativo de viabilidad (50 % DMSO) y células sin estímulo, como se muestran en la Figura 8. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO2 (5%) por 24, 48, 72 y 96 horas sin cambio de medio de cultivo. Una vez cumplido cada tiempo de incubación, se adicionó Alamar Blue® (10 % en volumen) en cada pozo, en total oscuridad y se incubó por 4 horas a 37 °C en atmósfera de CO2 (5%).

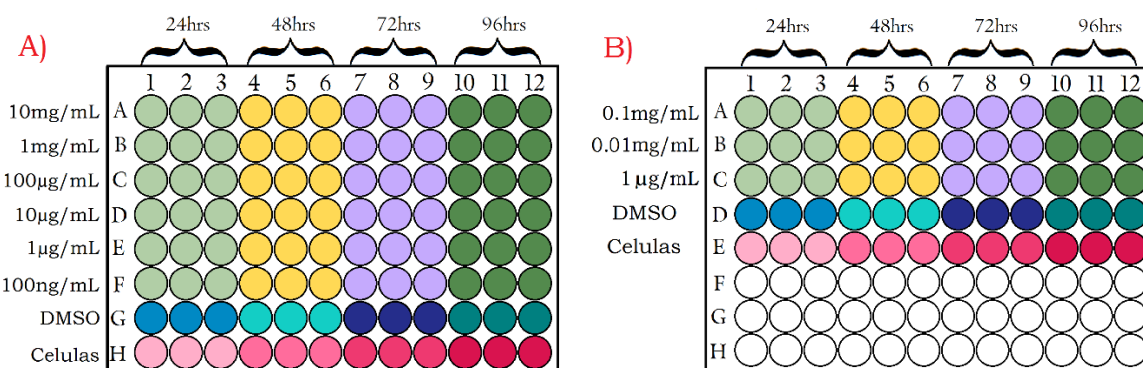


Figura 8. Esquema representativo del ensayo de viabilidad para A) NPETd y B) NPETn.

La viabilidad de las muestras se cuantificó con el mismo reactivo (Alamar Blue), pero por dos técnicas de espectrometrías diferentes. Para las células que estuvieron en contacto con las NPETn, se utilizó el espectrofotómetro por Absorbancia UV-Vis marca Thermofisher Scientific, modelo Multiskan GO y para las células incubadas con NPETd, el análisis se realizó por espectrofluorimetría (560/590 de excitación/emisión) con un Espectrómetro de fluorescencia marca Agilent, modelo Cary Eclipse.

Para determinar la diferencia en porcentaje de reducción entre muestras tratadas y células control, por absorbancia, se utilizó la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$\frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

Donde:

O1 es el coeficiente de extinción molar (E) del alamar blue oxidado a 570 nm = 80586.

O2 E del alamar blue oxidado a 600 nm =117216.

A1 valor de la absorbancia del pozo medido a 570 nm.

A2 valor de la absorbancia del pozo medido a 600 nm.

P1 absorbancia positiva del pozo control positivo de viabilidad (células + alamar blue) a 570 nm.

P2 absorbancia positiva del pozo control positivo de viabilidad (células + alamar blue) a 600 nm.

Para determinar la diferencia en porcentaje de reducción entre muestras tratadas y células control, por fluorescencia, se utilizó la siguiente ecuación (Ec. 2):

$$\frac{FI\ 590(\text{agente de prueba})}{FI\ 590(\text{control sin tratamiento})} \times 100$$

Donde:

FI 590 = Intensidad fluorescente en 590 nm emisión y 560 nm excitación.

6.3.2.3 Concentración de nitritos.

La reacción de Griess consiste en la diazotización (proceso químico mediante el cual una amina aromática primaria rompe su cadena cíclica para convertirse en un compuesto diazonio) que ocurre en dos pasos. Primero los nitritos acidificados producen un agente nitrosido que reacciona con el ácido sulfanílico para producir el ion diazonio. El siguiente paso de la reacción es cuando el ion diazonio se aparea con N-(1-naftil) etilendiamina para formar el cromóforo azo derivado que absorbe a 540 nm (longitud de onda requerida en el espectrofotómetro para medir la concentración de nitritos en la solución). La concentración de nitritos (NO₂) como producto de la transformación de óxido de nitrógeno (NO), nos permitirá analizar la actividad de fagocitosis realizada por los macrófagos en presencia de las NPET, como una medida representativa de una respuesta inmune desencadenada por la presencia de un agente externo.

Para este ensayo 1x10⁴ células fueron sembradas en una placa de 96 multipozos en presencia de diferentes concentraciones de NPETd y NPETn (10 mg, 1 mg, 0.1 mg, 0.01mg, 0.001mg, 0.0001mg, 0.00001 mg) por 24 horas a 37 °C con 5 % de atmósfera de CO₂. Una vez pasados los tiempos de incubación correspondientes, se extraen 50 µL de medio de cada pozo y se colocan en una placa de 96 multipozos. De acuerdo con el protocolo, se colocan 50 µL de sulfonamida se dejaron incubar a temperatura ambiente cubierto de cualquier fuente de iluminación, por 10 minutos dejando que ocurra la reacción correspondiente (en donde los nitritos forman una sal de diazonio). Posteriormente, se añade el reactivo N-1-naftiletildiamina (NED) dejándolo incubar durante otros 10 minutos en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo Multiskan GO.

Dos ensayos fueron realizados, en el primer ensayo (Figura 9B), ambas muestras de NPET fueron analizadas en un lapso de tiempo de 24 horas. Se optó por realizar un segundo ensayo en el que solamente se analizarían NPETd junto con un control de células (Figura 9A), además de extender el experimento a un lapso de tiempo de 96 horas.

6.3.3 Ensayo de cultivo de microalgas.

Para los ensayos de microalgas, fueron utilizadas únicamente las NPETd, debido a la mayor cantidad de nanopartículas con dimensiones dentro de la escala nanométrica, a diferencia de las NPETn. La cepa de microalga utilizada fue *Isochrysis Galbana*, clon T-ISO (ISO), proporcionada por el laboratorio de microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanográficas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC).

6.3.3.1 Solución stock de NPETd.

Como primer paso para el ensayo, se determinó la concentración de NPETd a evaluar. Sin embargo, hasta el momento no existe un referente en la literatura de la concentración de Nanoplásticos en el mar, por lo que se optó por usar una concentración que no tuviera un efecto en la cantidad de luz proporcionada al cultivo. Para esto, se preparó una solución stock de NPETd con una concentración de 5 mg/mL y a partir de dicha solución, se hicieron 6 soluciones seriadas 1:10, observadas en la Figura 10. Se utilizó un volumen igual de agua mili-Q como referencia. Con este sencillo experimento, se determinó a simple vista, que a partir de la concentración de 5 µg/mL, la turbidez en el medio era muy similar al agua sin otras sustancias, seguía habiendo nanopartículas detectadas por medio del ZetaSizer marca Malvern modelo NANO Series, por lo que se decidió que 5 µg/mL sería la cantidad a usar en los siguientes experimentos.



Figura 10. Diluciones seriadas de NPETd en agua ultra pura.

6.3.3.2 Cultivo algal.

El mantenimiento y crecimiento de *Isochrysis galbana* se realizó con base en los protocolos de rutina usados para esta especie en el Instituto de Investigaciones Oceanográficas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC). Bajo un ambiente estéril, en un matraz Fernbach, se colocaron 1.5 L de agua de mar natural, previamente pasteurizada (90 °C) y filtrada (filtro de polipropileno de 1 µm y filtro de membrana de 0.22 µm). El agua se esterilizó en autoclave (121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos) y una vez que se enfrió fue enriquecida con medio

Guillard F/2 de la marca Fritz denominado F/2 algae food (<https://fritzaquatics.com/products/f-2-algae-food>). Por último, el medio se inoculó con 40 mL de la cepa y el cultivo fue mantenido en condiciones controladas a una temperatura de 22 ± 1 °C, iluminación continua con luz led blanca a 700 lx y agitación manual intermitente.

6.3.3.3 *Incubación de microalgas en presencia de NPETd.*

Una vez inoculado el cultivo de microalgas, se añadieron 200 mL de inoculo inicial en 4 matraces Erlenmeyer de 250 mL. A tres de los matraces se le adicionaron 200 µL de NPETd solución stock, para una concentración final de 5 µg/mL, identificados como PET1, PET2 y PET3. El matraz restante, quedo como referente de crecimiento sin estimulo, identificado como CONTROL. En un quinto matraz, con un volumen de 25 mL y con una concentración final de 5 µg/mL de NPETd, previamente teñidas con RN, esto con la finalidad de poder seguir, identificar y diferenciar a las nanopartículas del resto de organelos celulares de las microalgas.

Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C), iluminación continua (luz led blanca a 700 lx) y agitación manual.

6.3.3.4 *Viabilidad y proliferación de cultivo de microalga.*

Para la lectura y cálculo de la viabilidad y proliferación relativa de las microalgas se llevaron a cabo dos métodos de análisis.

6.3.3.4.1 *Densidad Óptica.*

La biomasa relativa del cultivo de microalgas se cuantificó con el espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo Multiskan Go cada 24 horas como la diferencia en la turbidez del medio (DO=750 nm) entre el matraz experimental y el blanco (Baudrimont et al., 2020; Tetu et al., 2019). Este procedimiento es una de las metodologías más sencillas e indirectas para cuantificar la concentración relativa de microalgas. Los valores fueron corregidos con la DO del blanco (Medio de cultivo F1/2 con nanopartículas), de acuerdo a la ecuación 3 (Ec. 3)

$$DO_{(f)} = DO_{(micro)} - DO_{(bl)} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

$DO_{(f)}$ es la densidad óptica final.

$DO_{(bl)}$ es la densidad óptica del blanco.

$DO_{(micro)}$ es la densidad óptica del cultivo a los diferentes tiempos.

6.3.3.4.2 Citometría de flujo.

En segundo caso, se usó la citometría de flujo como método para el conteo de células, el cual, al ser un sistema automatizado, permite una rápida cuantificación de grandes cantidades de células en suspensión, por medio del análisis de espectros de dispersión de luz.

La determinación de la biomasa (cel/mL) se realizó cada 24 horas, en el citómetro de flujo marca Thermo Scientific, modelo Attune® Acoustic Focusing Cytometer, con el filtro BL1 (530 nm), el cual es capaz de identificar la presencia de clorofila α , de esta manera fue posible discriminar entre células que presentaron fluorescencia (consideradas “células vivas”) y partículas/células que no presentaran fluorescencia (consideradas “muertas”).

6.3.3.5 *Observación por microscopía confocal.*

Para observar a las células, tanto los macrófagos como las microalgas por medio de microscopia confocal, fue necesario hacer un marcaje fluorescente específico para cada tipo de celular. Se realizó el marcaje de las mitocondrias de las microalgas por medio de la técnica MITO-ID Red. Para lo cual, se colocó una alícuota (1 mL) en un microtubo de 1.5 mL del cultivo microalgal a 24 horas, tanto de microalgas en contacto con NPETd teñido con RN y sin teñir, y un cultivo control. Los cultivos fueron centrifugados por 5 minutos a 400 g a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 50 μ L de la solución Dual Detection Reagent del KIT Mito-ID Red (558/690 excitación/emisión), las células fueron dispersadas suavemente y se incubaron a 37 °C por espacio de 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células con solución buffer, se centrifugaron de nuevo y se adicionó glutaraldehído al 4 %, protegidas de la luz, por espacio de 30 minutos a 4 °C. Se lavaron 2 veces con PBS 1X y se colocaron en portaobjetos con solución de glicerol 50/50 para su observación con un microscopio Confocal marca Olympus, modelo fv1000. Debido a que la clorofila es auto fluorescente (495/519 excitación/emisión) no fue necesario teñir algún componente más de las células.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NPET.

La obtención de las nanopartículas de PET fue realizada por dos técnicas diferentes, como se mencionó anteriormente. La primera técnica, por trituration mecánica bajo nitrógeno líquido (NPETn), con el fin de fragilizar el material. Sin embargo, la primera dificultad observada con este procedimiento fue la cantidad de material obtenido, ya que, por cada gramo tamizado y triturado, se obtenía aproximadamente 10 µg de NPETn con dimensiones menores a 1 micrómetro, además de ser difíciles de separar de las partículas más grandes.

Por otra parte, al utilizar el método de dilución y precipitación ácida (NPETd), se obtuvieron nanopartículas más pequeñas, con un rango de tamaños de 50 a 200 nm. Cabe señalar que el rendimiento observado en este procedimiento fue mayor, ya que más del 80 % del volumen disuelto, precipita con estas dimensiones.

7.1.1 Morfología y dimensiones.

Las imágenes de microscopia electrónica de transmisión para NPETn (Figura 11) muestran nanopartículas esféricas con dimensiones de 4-12 nm. En la figura 11.A, la imagen de mayor magnificación muestra la presencia de los arreglos cristalinos de una partícula de NPETn (flecha blanca). En la figura 11.B, puede observarse la distribución de tamaños en 3 grupos: 60-90 nm, 100-200 nm y 200-350 nm.

Sin embargo, al momento de sintetizar, la cantidad de muestra que resulto ser nanopartículas fue escasa. A pesar de que se obtienen partículas de menor tamaño, gran porción de materia inicial queda asentado en el fondo, como partículas de mayor tamaño.

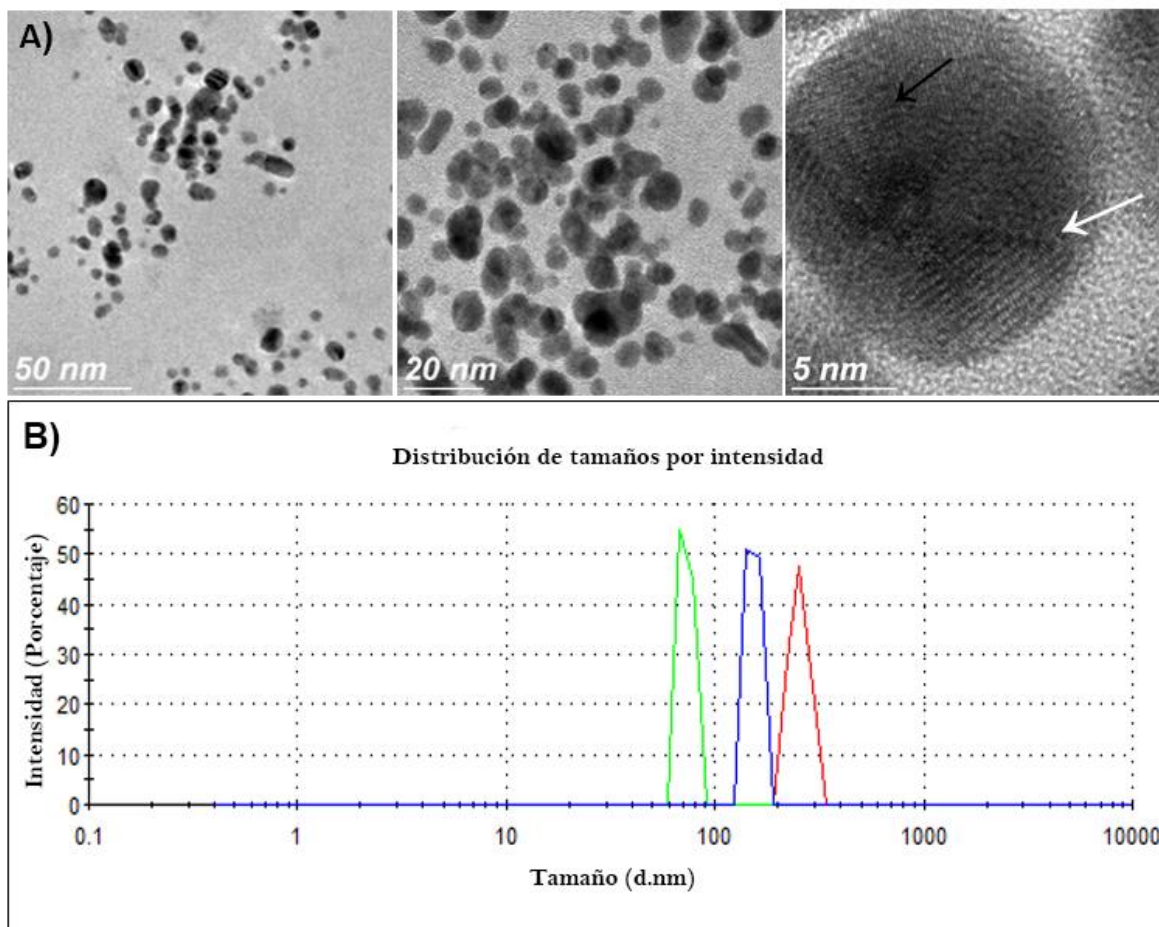


Figura 11. A) Imágenes de TEM y B) diámetro hidrodinámico de las muestras NPETn.

Las imágenes de TEM para las NPETd (Figura 12.B), muestran partículas con dimensiones entre los 50-200 nm, con una forma irregular, y una superficie rugosa incluso con cierta porosidad. Por otro lado, los resultados de DLS (Figura 12.A) muestran que cuentan con un diámetro hidrodinámico de 224 ± 46 nm (Rodríguez-Hernández et al., 2019).

Los resultados indican que ambas metodologías permitieron obtener NPET; sin embargo, presentan diferencias entre cada una de ellas. Por la técnica de trituración se obtuvieron nanopartículas más homogéneas en cuanto forma y tamaño, al contrario de la técnica de disolución ácida. Sin embargo, la cantidad obtenida de NPETn en el proceso de trituración mecánica es muy pequeña comparada con la cantidad obtenida de NPETd.

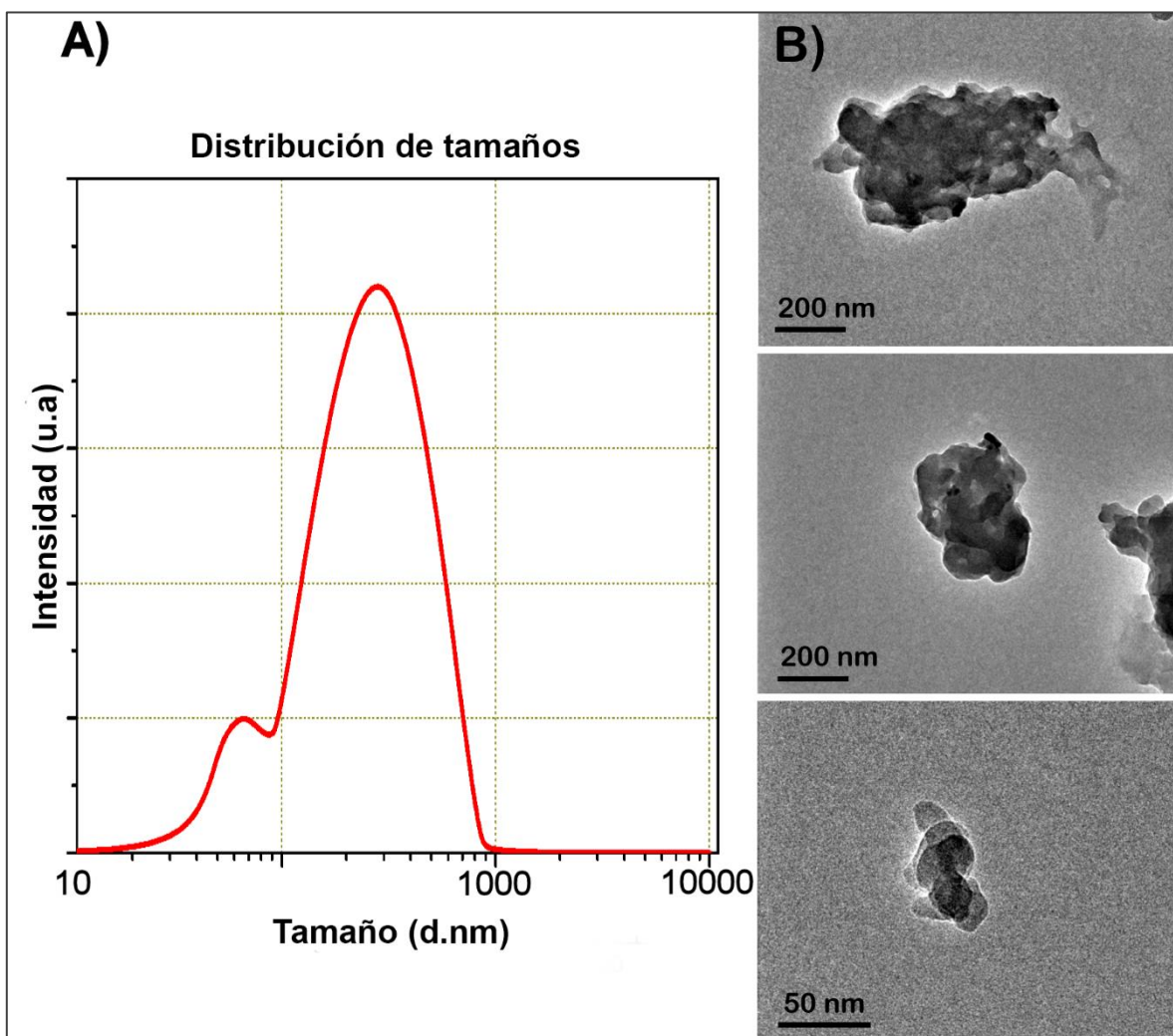


Figura 12. A) Diámetro hidrodinámico e B) imágenes de TEM campo claro de NPETd. Obtenido de Rodríguez-Hernández et al. 2019.

Por otro lado, los resultados de DLS muestran distribuciones de diámetro hidrodinámico diferentes, comparado con lo observado por TEM. Como suposición, puede deberse a que existe una aglomeración de las partículas debido al medio en el cual se encuentran dispersas, por lo que, al ser analizadas por DLS, el tamaño parece mayor.

Por lo tanto, considerando los resultados de ambas muestras, se puede decir que las nanopartículas NPETd podrían ser más semejantes a lo que se espera encontrar disperso en el ambiente con formas y tamaños muy variados, comparado con las obtenidas por trituración mecánica con forma esférica y muy regular en cuanto al tamaño. Además, con una menor cantidad en cuanto a la producción necesaria para poder llevar a cabo los estudios posteriores y que sirvan de modelo para otros ensayos.

7.1.2 Difracción de rayos X (XRD).

La Figura 13 presenta los difractogramas obtenidos de las muestras de NPET y sus índices de Miller correspondientes identificados a partir de la tabla cristalográfica 00-060-0989 mostrada anteriormente (Figura 6).

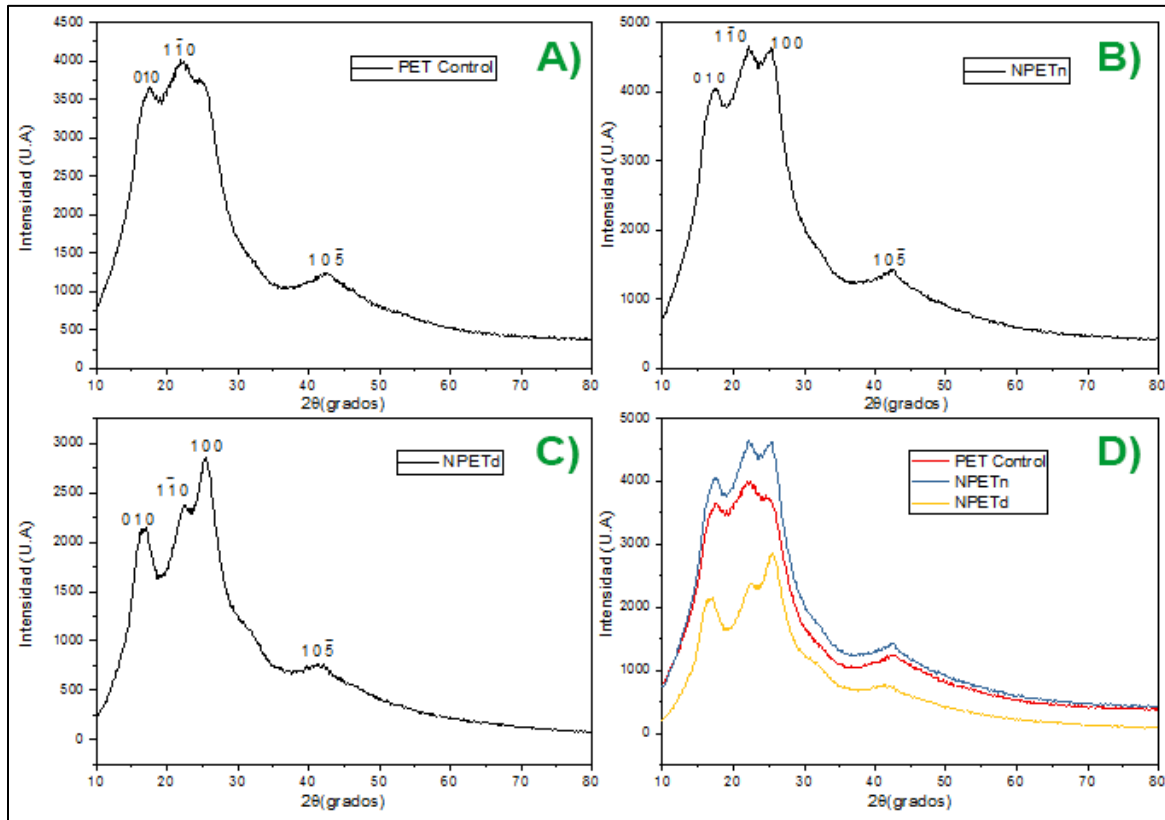


Figura 13. Patrón de Difracción de XRD, de A) PET control, B) NPETn, C) NPETd y D) comparación de las 3 muestras.

Fue posible identificar los planos (010) (100) ($1\bar{1}0$) y ($10\bar{5}$), siendo los tres primeros picos característicos de del tipo de polímero y lo que indica que todas las muestras cuentan con una estructura semi cristalina. (Johnson, 1959; Singh et al., 2017; Wang et al., 2009)(Johnson, 1959)

En la Figura 13-D, puede observarse que la relación de intensidad entre los picos de los planos (010) (100) ($1\bar{1}0$) cambian considerablemente en la muestra NPETd. A pesar de estas variaciones, los procesos a las que fueron sometidos las muestras, parecen no afectar la estructura cristalina. Esta diferencia puede deberse a la orientación preferencial de la fase cristalina del material. Cabe mencionar que la muestra denominada PET control, corresponde a la base de una botella comercial de agua (la cual fue usada para la obtención de las nanopartículas) y el proceso de termoformado de la botella, orienta las moléculas y la fase cristalina del material, en función de la orientación del esfuerzo al momento de la fabricación de la botella (Gruenwald, 1998). Mientras que en el caso de las muestras NPETn y NPETd, el proceso de obtención elimina esa orientación, lo que se traduce como una diferencia en cuanto a la relación de los picos.

7.1.3 Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA & DSC).

El análisis termogravimétrico es un método por el cual la muestra es expuesta a un cambio de temperatura por un periodo de tiempo, utilizando una tasa de calentamiento constante, lo cual proporciona información de sus propiedades físicas. En este sentido fueron analizadas las muestras NPETn y NPETd, así como una muestra control.

En el análisis de TGA & DSC (Figura 14), se observa un patrón de curva escalonado en la pérdida de peso para todas las muestras, misma curva de comportamiento que se han reportado al analizar partículas de PET obtenidas a partir de botellas plásticas comerciales (Das & Tiwari, 2019; Miranda Vidales et al., 2014). Este comportamiento es comúnmente asociado a un cambio/transformación estructural, también podría deberse al uso de PET reciclado. En las gráficas de DSC, el PET control y NPETn presentaron un proceso endotérmico alrededor de los 250°C, asociado al proceso de fusión del PET, las tres muestras presentaron dos procesos exotérmicos durante el calentamiento del PET, asociados con el proceso de degradación de la muestra, en el segundo evento de degradación existe una mayor liberación de energía que la del primer evento.

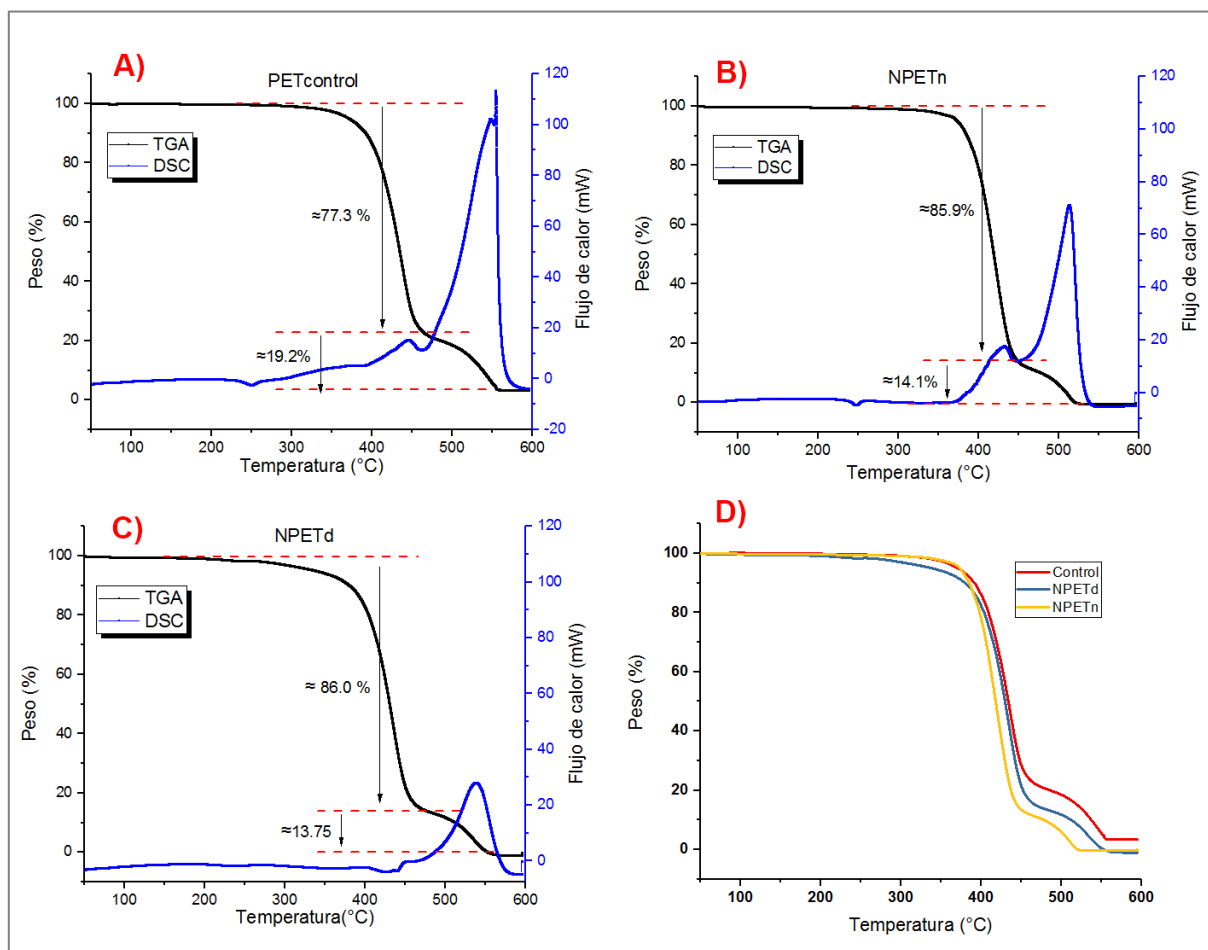


Figura 14. Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido de A) PET control, B) NPETn, C) NPETd y D) la comparación de las 3.

Este comportamiento difiere de partículas de PET de forma pura, es decir sin ningún aditivo adicionado. Experimentos donde el PET era proveído por alguna compañía, el análisis de TGA de la muestra pura mostraba una degradación que sucedía de forma directa y perdiendo $\approx 80\%$ de su peso inicial. (Masmoudi et al., 2018; Mohammed Khalaf, 2016; Wang et al., 2009)

En la figura 14.D, al comparar las muestras puede verse como las NPETd son las primeras en degradarse a una temperatura de $\approx 300^\circ\text{C}$, mientras que el Control y las NPETn empiezan a degradarse a una temperatura de $\approx 400^\circ\text{C}$. Después de los procesos sometidos, el PET pierde estabilidad térmica.

7.2 EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA.

7.2.1 Ensayo de cultivo celular.

Las pruebas de observación y seguimiento de ensayos en cultivos celulares de macrófagos en presencia de NPET nos dan una primera prueba si existe un efecto toxicológico en las células, analizando los efectos en su viabilidad por comparando los cambios morfológicos que pueden sufrir las células.

7.2.1.1 Proliferación y Viabilidad.

Para obtener la viabilidad y proliferación de las células en presencia de NPET, el crecimiento del cultivo se compara con el de la muestra control, por lo que los resultados se encuentran como porcentajes, siendo el cultivo de células control el 100%.

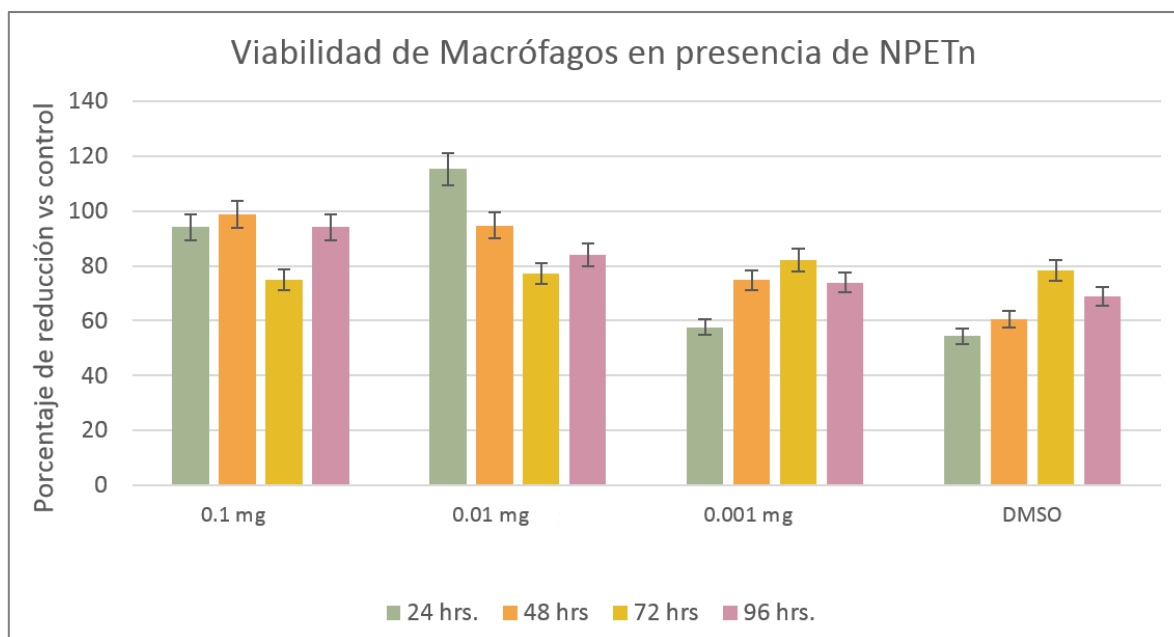


Figura 15. Viabilidad de células macrófago RAWBlue en presencia de NPETn, por ensayo colorimétrico Alamar Blue en un tiempo de 96 horas.

Cuando las células son incubadas en presencia de NPETn (Figura 15), la concentración de 0.1 mg/mL afectado especialmente a las 72 horas, donde se sufre un decaimiento. Por otro lado, la viabilidad en una concentración de 0.01 mg/mL, supera al control en las primeras 24 horas, lo cual podría significar en una respuesta inmediata por parte de las células al detectar su presencia, para después sufrir una rápida disminución. A una concentración de 0.001 mg/mL, la viabilidad presenta una disminución considerable de las células a 24 horas al 57%, en comparación del control, y poco a poco incrementando los valores, sin embargo, no alcanza el 100 %, comparable con las células que se encuentran en presencia DMSO al 10 %. Contrario a lo que se esperaba, la menor concentración de NPETn fue la que ocasionó un mayor efecto negativo en la viabilidad de los macrófagos, comparado con las otras concentraciones, en donde solo mostró efectos adversos a las 72 horas.

Por otro lado, en presencia de NPETd (Figura 16) se pudo observar que el número de células viables mostro diferencias significativas en cuanto a concentración y tiempos de incubación. Puede verse que la viabilidad se vio disminuida considerablemente con 10, 1 y 0.0001 mg/mL durante todo el ensayo.

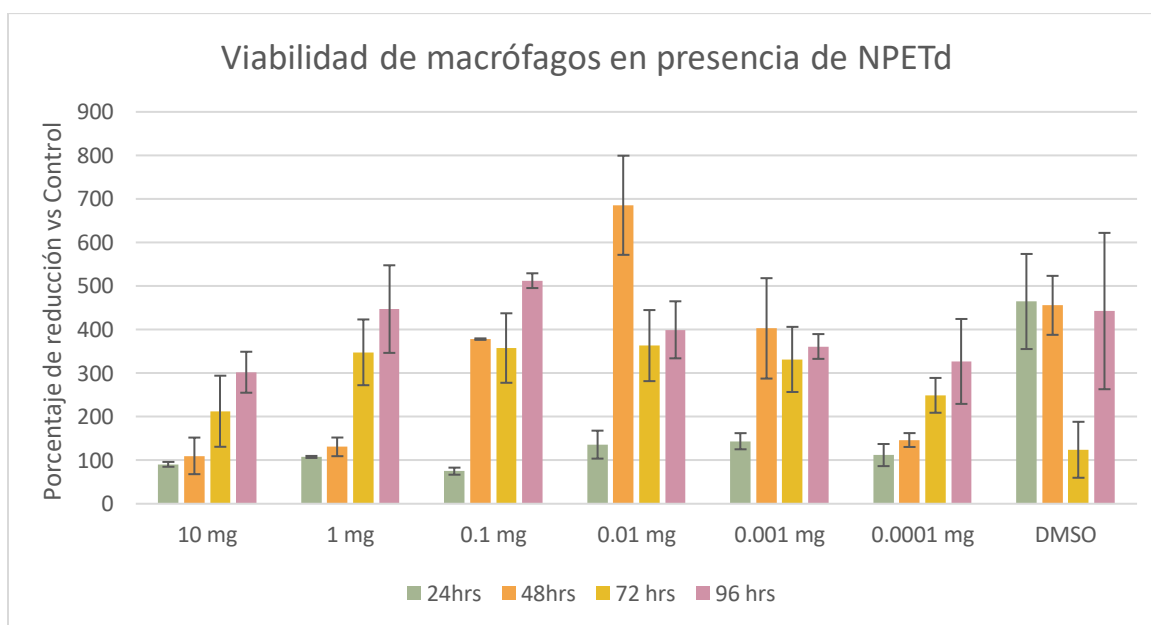


Figura 16. Viabilidad de Células macrófago RAWBlue en presencia de NPETd, por ensayo colorimétrico Alamar Blue en un tiempo de 96 horas.

Sin embargo, podemos ver que a 48 horas todas las concentraciones, existe un incremento considerable en la viabilidad, siendo significativamente diferente con la concentración de 0.01 mg/mL, seguido de 0.001 mg/mL. Además, podemos apreciar que las concentraciones de 0.1 y 0.01 mg/mL tiene dos incrementos en la viabilidad a 48 y 96 horas. Por otro lado, se observa que la menor concentración 0.0001 mg/mL presentó un comportamiento diferente, ya que se observa un continuo y constate incremento en la fluorescencia. Esto podría deberse a que al ser tan baja la concentración, las células rápidamente se adaptan a la presencia del material en el medio de cultivo.

7.2.1.2 Concentración de nitritos.

Considerando que, La viabilidad es solo un parámetro para determinar la toxicidad de las NPET, se analizó la producción de nitritos en el medio, el cual es un parámetro que indica que efectivamente sí existe un proceso de fagocitosis; esto considerando que las células en este estudio son macrófagos, cuya función principal es la de internalizar antígenos (de cualquier naturaleza), con la finalidad de eliminarlos.

Un primer ensayo fue realizado para observar el impacto en las primeras 24 horas de contacto con ambas nanopartículas, NPETn y NPETd (Figura 17). Lo primero que se observa es la diferencia en cuanto a la cantidad de nitritos detectados para cada muestra; siendo las muestras de NPETd las que obtuvieron una mayor producción de nitritos. Además, la respuesta parece estar asociada directamente a la concentración, ya que, para ambas muestras, 10 mg/mL y 10 ng/mL de NPET, fueron las que presentaron mayor cantidad de nitritos.

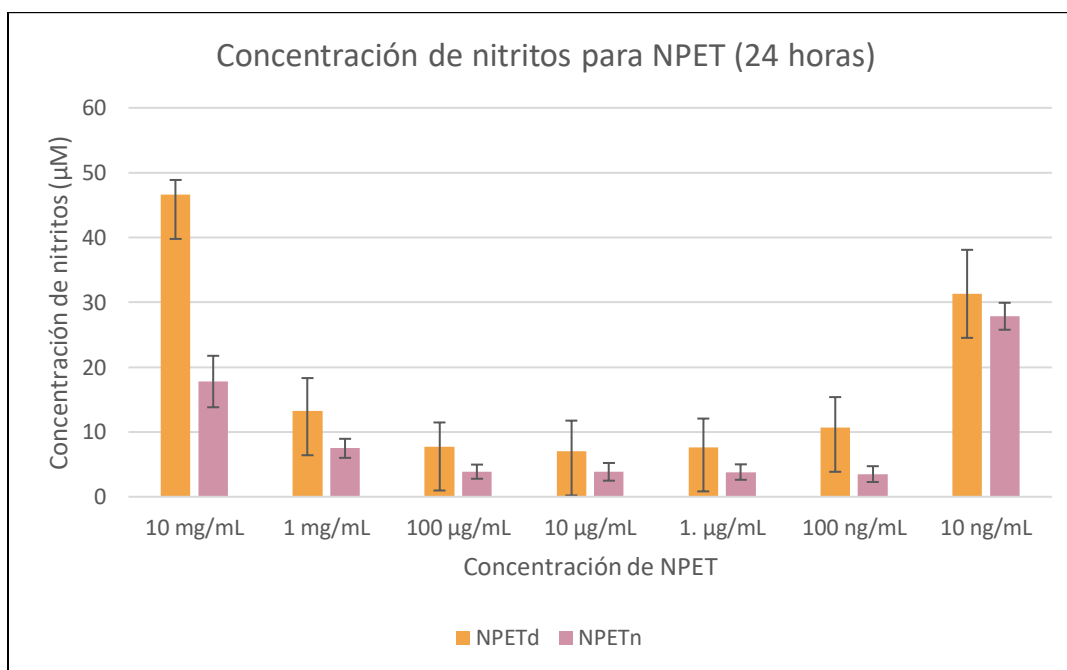


Figura 17. Producción de nitritos de macrófagos RAWBlue en presencia de NPETn y NPETd en un tiempo de 24 horas.

Dado que la muestra NPETd, fue la que mostró mayor diferencia de concentración de nitratos que NPETn para cada concentración NPET, se realizó un segundo ensayo extendido en el tiempo con uso exclusivo de NPETd (Figura 18). Puede apreciarse que se mantiene la tendencia en cuanto a la relación de cantidad de nitritos y concentración de NPETd. Además, puede observarse una misma tendencia de aumento para nitritos en cada cultivo, conforme este avanza el tiempo de incubación.

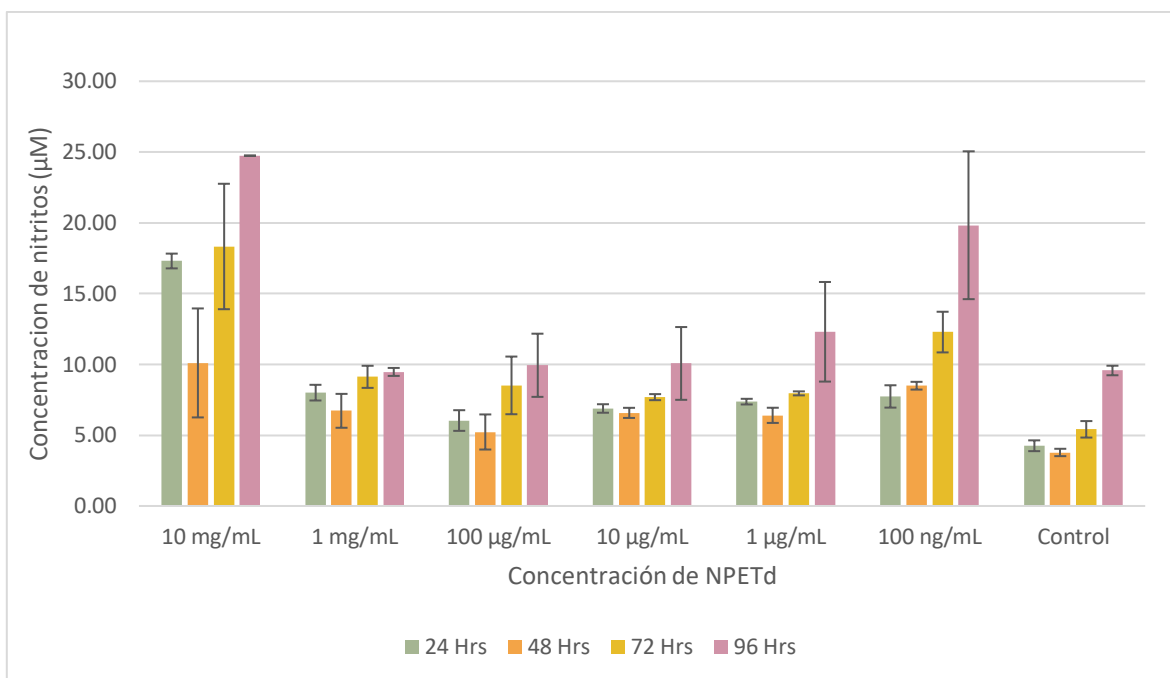


Figura 18. Producción de nitritos de macrófagos RAWBlue en presencia de NPETd, media cada 24 horas hasta 4 días de incubación *in vitro*.

7.2.1.3 Observación de microscopía de contraste de fases fluorescencia.

Para determinar los efectos de las NPET en las células se siguió con la estrategia de seguimiento visual por microscopía, las primeras observaciones se realizaron por microscopía óptica. En las Figuras 19 y 20 se observa el marcaje de una muestra con RN, el cual permite hacer un seguimiento de la misma zona, facilitando el ser identificado y diferenciado del resto de células en el cultivo. La estrategia de marcar con RN a los MP fue propuesta por Maes (Maes et al., 2017), el cual sirvió de base para su marcaje y seguimiento dentro de las células protocolo modificado por Rodríguez-Hernández.

Las imágenes muestran la facilidad con la que se pueden observar los MP por contraste de fases, mientras que el RN, permite su identificación en el filtro verde (Excitación 470/40) como en el azul (Excitación 350/50). Aunque el ensayo fue realizado con ambas muestras de NPET, para este trabajo sólo se presentan los resultados en presencia de NPETn, esto debido a sus dimensiones (1-15 µm), el cual permitió un mejor proceso de seguimiento. En el caso de las NPETd (dimensiones de 50-200 nm), resultó imposible identificar una misma zona durante todo el ensayo, por falta de alguna referencia. El seguimiento fotográfico se llevó a cabo por 264 horas (11 días), con intervalos de observación cada 24 horas y sin cambio de medio, dando seguimiento a una partícula de PET en específico con un tamaño de ≈ 16 µm.

La Figura 19, muestra la micrografía bajo el objetivo 10X, con la imagen amplia del área donde se encuentra la micropartícula, la cual se encuentra rodeada de macrófagos y su alrededor. Mientras que en la Figura 20, muestra la micrografía bajo el objetivo 40X, con la imagen más ampliada y con mayor detalle de la micropartícula y las células de su alrededor.

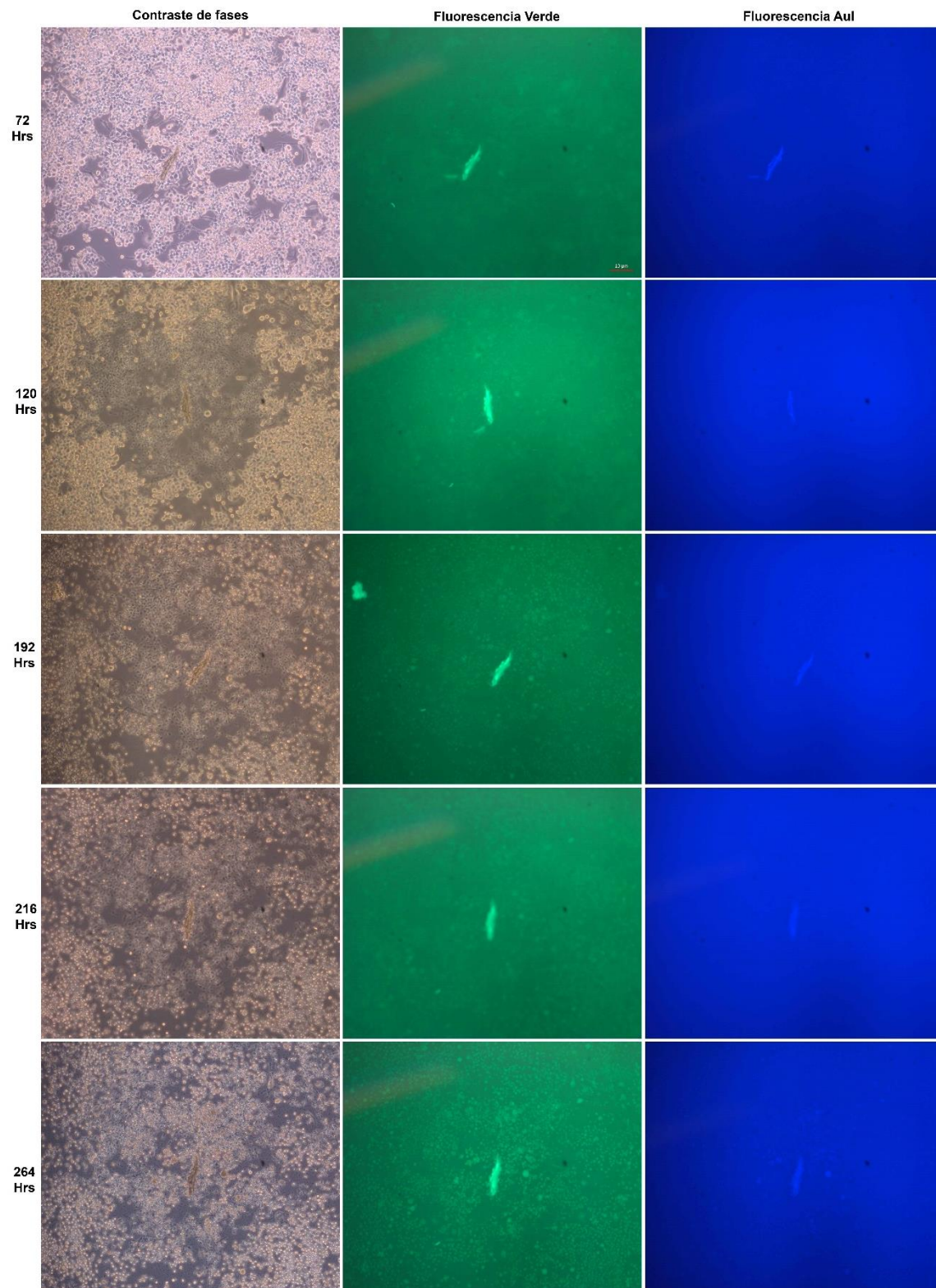


Figura 19. Imágenes de fluorescencia de macrófagos cultivados en presencia de NPETn, en las cuales se puede observar una partícula en el centro del campo de visión. Bajo objetivo 10X.

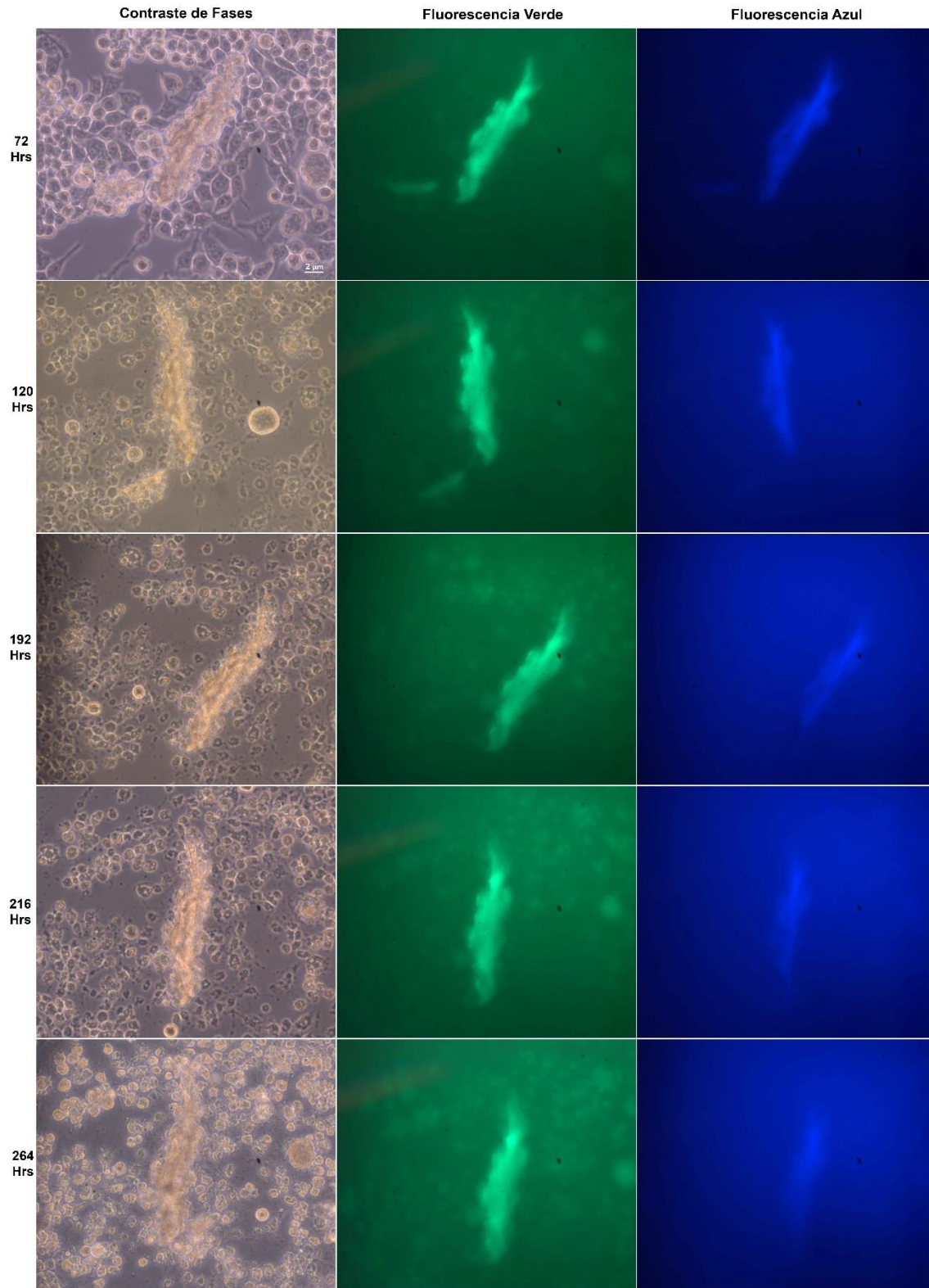


Figura 20. Detalle amplificado de las imágenes de fluorescencia de macrófagos cultivados en presencia de NPETn. Bajo objetivo 40X.

A las primeras 24 y 48 horas (datos no mostrados), la cantidad de células incrementa gradualmente y a las 72 horas se observa una gran cantidad de células alrededor e incluso por encima de la micropartícula. En el objetivo 40X, se corrobora lo anterior al ver con detalle las células y el cómo mantiene un contacto directo con la micropartícula (contraste de fases).

Un cambio significativo se observa a las 120 horas, donde se aprecia que un área de $\approx 4,540 \mu\text{m}^2$ alrededor de la partícula las células han cambiado su forma y tamaño. A partir de este tiempo, es identificable una zona de lisis celular que se extiende radialmente, hasta cubrir prácticamente el campo de visión a las 264 horas. Un detalle para apreciar en este lapso de tiempo, es que la intensidad de fluorescencia disminuye en el filtro azul, mientras que, en el filtro verde aparecen puntos fluorescentes alrededor de la micropartícula.

Bajo el objetivo 40X, las células que inicialmente presentaban la forma característica de los macrófagos; mostraron cambios morfológicos importantes y vestigios de lisis celular, se puede observar colapso de las células (encogimiento), con la posterior desintegración de la membrana celular (192 y 216 horas).

Además de las células, la partícula de PET presenta cambios a lo largo de las horas de incubación, en la señal azul, solamente la intensidad de la partícula disminuye, sin cambio de fluorescencia a su alrededor. En la señal verde, la intensidad de fluorescencia disminuye (fácilmente observable en el objetivo 40X), mientras que en el área circundante comienza a aumentar, correspondiente a las células que la rodean, lo cual podría indicar una ligera degradación de la superficie.

Esto podría deberse a que los macrófagos están intentando fagocitar los plásticos, al considerarlo un agente extraño dentro del cultivo, mientras que la fluorescencia que se detecta se interpreta como la presencia del PET al ser internalizado. Sin embargo, existe la duda si el material es capaz de penetrar la membrana celular, por lo que se recurrió a la microscopia confocal.

7.2.1.4 Observación de microscopía confocal.

Las imágenes de microscopía confocal de las células solas y las células incubadas en presencia de NPETn y NPETd, muestran a los macrófagos perfectamente bien identificados por el marcaje de Alexa 488 (verde) y el DAPI (azul) los cuales corresponden a la actina del citoesqueleto y al núcleo respectivamente (Figura 21). En ambos casos para las NPET (Rojo), se encuentran alrededor de las células y en algunos se pueden ver en el interior de las células.

Comparando la forma y tamaño de las células, puede verse que, las NPETn afectan el tamaño de las células. También es posible identificar en el centro de la imagen un macrófago, el cual ha incrementado su tamaño y que presenta claramente nanopartículas marcadas con RN en el interior. Debe destacarse también que en el interior se pueden identificar 4 núcleos, lo cual, aunado al tamaño, podría estar asociado a la formación de una célula gigante. Este tipo de células, se dan por la fusión de varios macrófagos y se ha visto que este comportamiento está relacionado con el tamaño del objeto a fagocitar, mientras que, en presencia de las NPETd, los macrófagos se mantienen igual al grupo control.

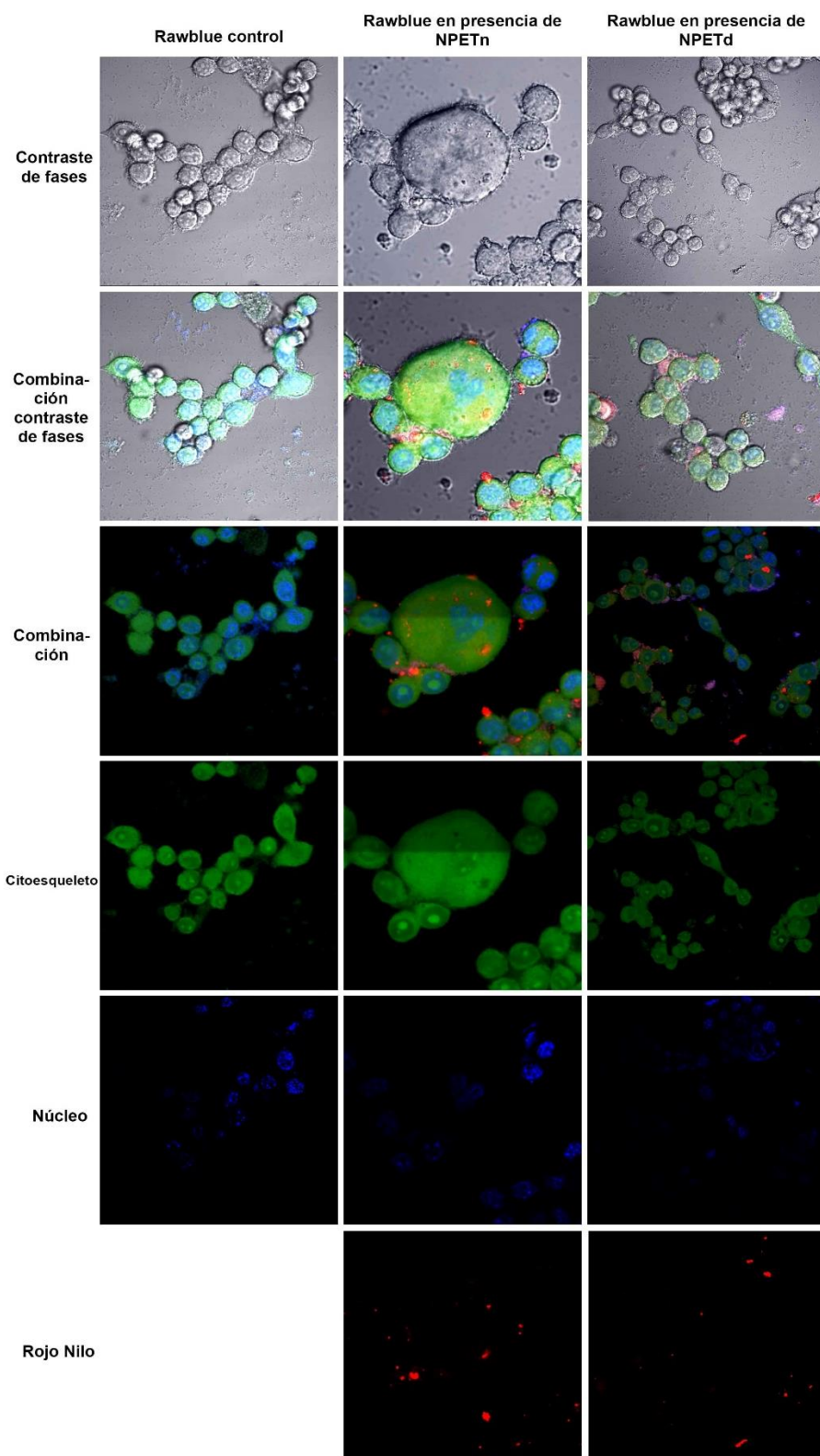


Figura 21. Imágenes de confocal de macrófagos en presencia de NPETn y NPETd. El color azul (DAPI) corresponde al núcleo celular, color verde (citoesqueleto) corresponde a la actina y color rojo (Rojo Nilo) corresponde a NPET.

7.2.2 Ensayo con microalgas.

7.2.2.1 Viabilidad y proliferación del cultivo de microalgas.

Como se mencionó anteriormente, la ubicuidad del plástico implica la diversidad de organismos que pueden entrar en contacto con los MP y NP; por lo que las microalgas son un buen modelo de estudio para analizar el impacto que estos puedan tener en el ambiente debido a su importancia dentro de la cadena trófica.

7.2.2.1.1 Densidad óptica.

Los primeros resultados se obtuvieron por medio del registro de la densidad óptica del cultivo comparando la respuesta de las microalgas en presencia y ausencia de NPETd (Figura 22).

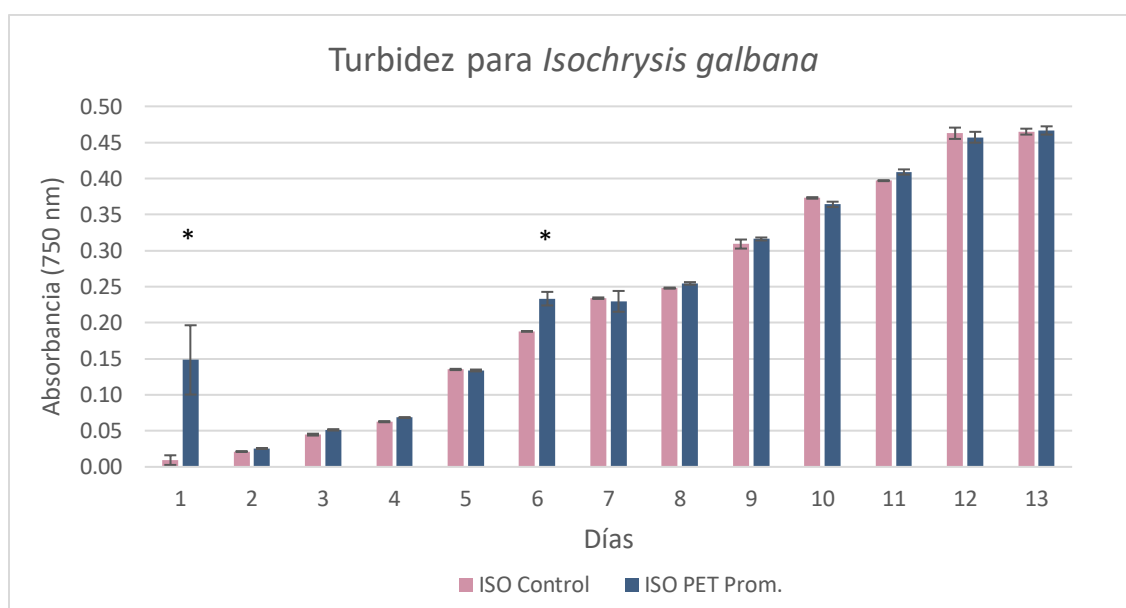


Figura 22. Densidad óptica de cultivos microalgales en presencia y ausencia de NPETd. Los datos representados son el valor promedio de 3 ensayos independientes.

Ambos cultivos presentan una misma tendencia de incremento de la turbidez del medio conforme pasa los días de incubación, lo cual indica un crecimiento homogéneo y similar del cultivo. Sin embargo, en el día uno y el día seis hubo una diferencia significativa (indicado con un *) entre el grupo control y el grupo en presencia de NPETd, siendo este último el que mostró una mayor turbidez. Una posible respuesta para esta observación es que existan aglomeraciones de NPETd, dentro de las primeras 24 horas, debido al medio usado el cual favorece la aglomeración. Sin embargo, no explica que después de 24 horas desaparezca y reaparezca a los 6 días. Aunque la turbidez del cultivo es una medida indirecta de la biomasa, en los resultados se dificulta el análisis de la respuesta asociada a los Nanoplásticos, por lo que se recurrió al uso de la citometría de flujo.

7.2.2.1.2 Citometría de flujo.

Por medio de la técnica, fue posible realizar una cuantificación más precisa de cada cultivo, además de que la técnica permite analizar la cantidad de clorofila α debido al filtro BL1. En la figura 23 se observa en la gráfica obtenida por citómetro de flujo que, la cual señalaba la complejidad de la célula (eje y) y el tamaño de la partícula (eje x). A partir de estos datos y de la presencia de clorofila α que se detectaba fueron clasificados 4 eventos, R1 como “células vivas” (por mostrar señales de clorofila α) y los eventos R2, R3 y R5 como “células muertas” (por ausencia de señal de clorofila α). Los resultados mostraron un porcentaje diferente entre los cultivos de microalgas control y los cultivos en presencia de NPETd

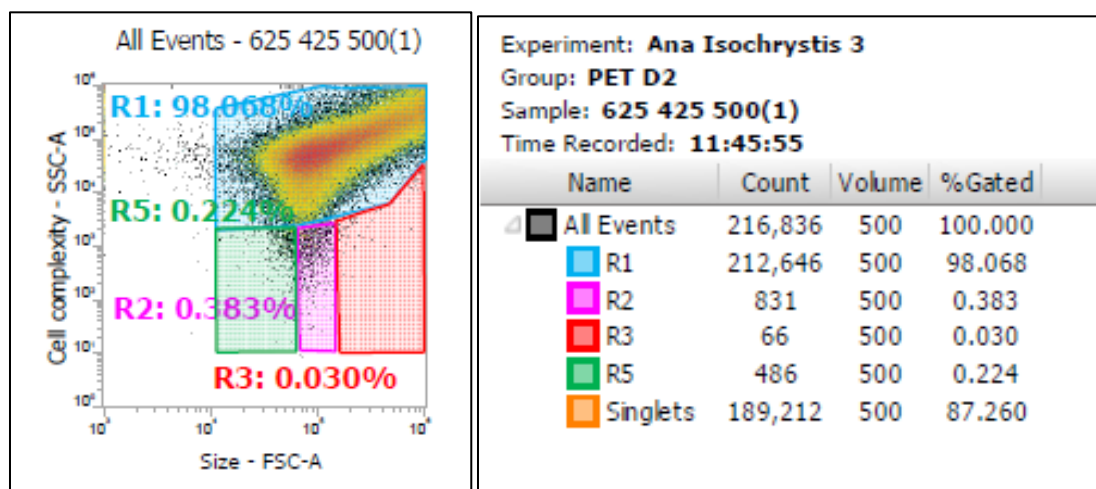


Figura 23. Gráficas obtenidas por citometría de flujo, en el cual se observan los cuadrantes delimitados para la determinación de las células vivas (R1) y “células muertas” (R2, R3 y R5).

En la Figura 24, los datos presentados en color azul claro corresponden a “células vivas” o que cuentan con presencia de clorofila α , el gris y naranja a “células muertas” o ausentes de clorofila α y el azul oscuro a partículas de naturaleza desconocida.

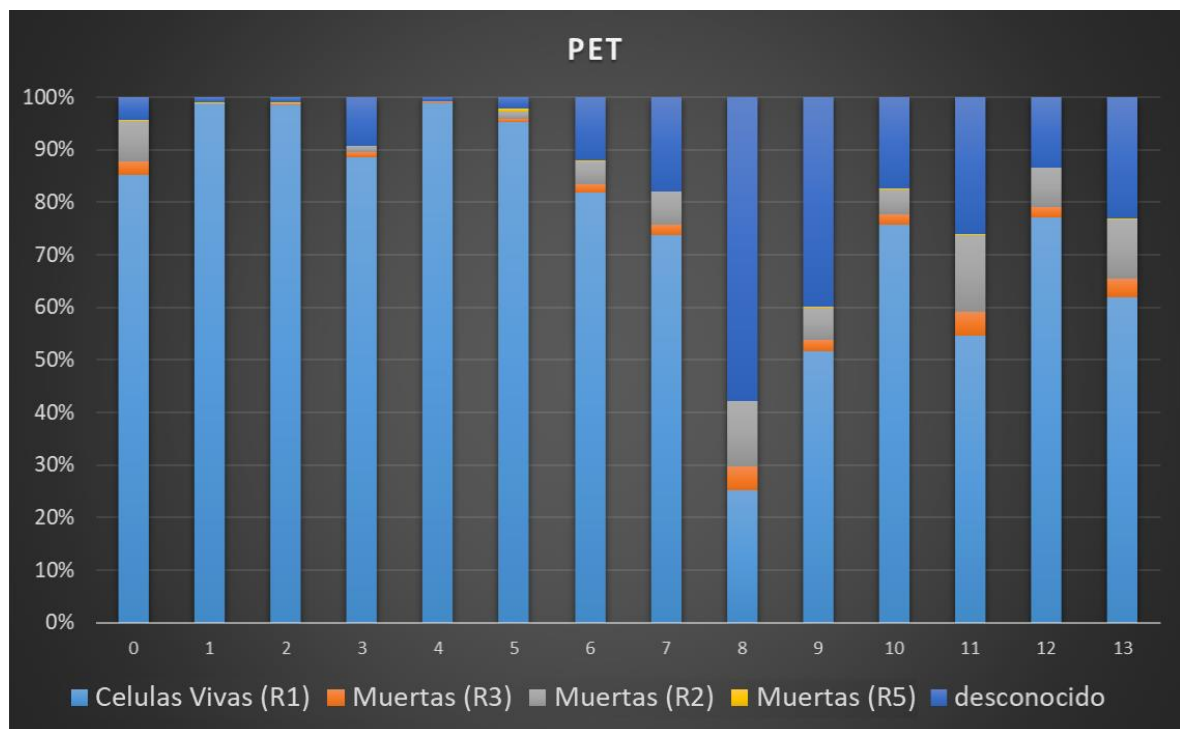
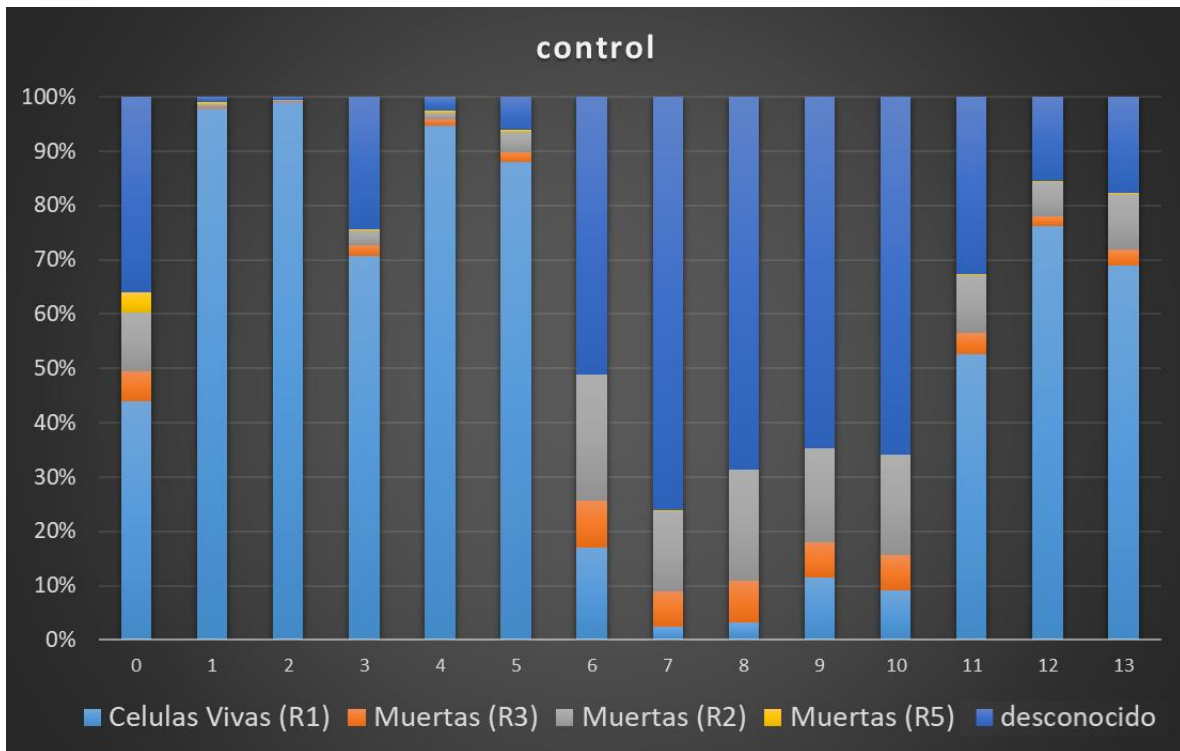


Figura 24. Graficas de los cultivos microalgales en presencia y ausencia de NPETd, analizados por citometría de flujo.

En las microalgas control, puede apreciarse la variación en el número de “células vivas”, en el cual se ve como el porcentaje disminuye drásticamente a los 6, 7, 8, 9 y 10 días para posteriormente observar un incremento en la cantidad de células, lo que se traduce como un nuevo ciclo. Por otro

lado, la señal identificada como “células muertas” en promedio corresponden a un 10%, siendo mayores en los 6,7,8,9 y 10 días, correspondiendo con el mismo ciclo que las “células vivas”. Además, se observó otro grupo que no entraba en las categorías anteriores ya que sus dimensiones no encajaban en los parámetros correspondientes y no presentaban fluorescencia.

En las microalgas en presencia de NPETd, puede apreciarse que el porcentaje de células vivas es mucho mayor, comparado con el control, siendo el día 8 el que presentó menor porcentaje. También se vio que el porcentaje de “células muertas” fue considerablemente inferior, ya que en promedio estas correspondían al 6%. Este resultado es totalmente contrario al esperado, ya que se consideraba que las NPET serían tóxicas y perjudiciales para la viabilidad de los organismos.

7.2.2.2 Observación de microscopía confocal.

Considerando lo anterior, surgió como duda el tipo de interacción de las NPETd con las microalgas, por lo que se recurrió a la microscopía confocal. En la figura 25 se observan las microalgas ISO como muestra control, con tinción en las mitocondrias, en presencia de NPETd sin teñir y NPETd teñidas con RN. En todos los casos se aprovechó la señal que la clorofila emitía (519nm) al ser excitada (495nm).

Además de la señal de la clorofila (verde) que permite ver que las células eran viables al momento de la observación, la señal en rojo es similar para el marcaje de las mitocondrias, las NPETd con RN y la propia auto fluorescencia de las células, por lo que fue difícil diferenciar entre las NPETd y el resto de estructuras.

Pudo observarse que había señal a la misma excitación y emisión que el RN (552/636) y que se sobreponía también con la señal del MITO-RED ID (558/690). Por lo que no fue fácil diferenciar a las nanopartículas marcadas con RN del resto de estructuras células.

Las imágenes que muestran a las ISO con las NPETd teñidas de RN, permiten observar que, a diferencia de las células macrófagos, los plásticos quedan acumulados alrededor de las algas y no se internalizan.

Otro detalle que destaca es la poca fluorescencia que presentan las NPETd que habían sido teñidas con RN, esto debido la constante presencia de luz en la se encuentran las microalgas. Por lo que la tinción de RN queda descartada como como una herramienta útil en el seguimiento.

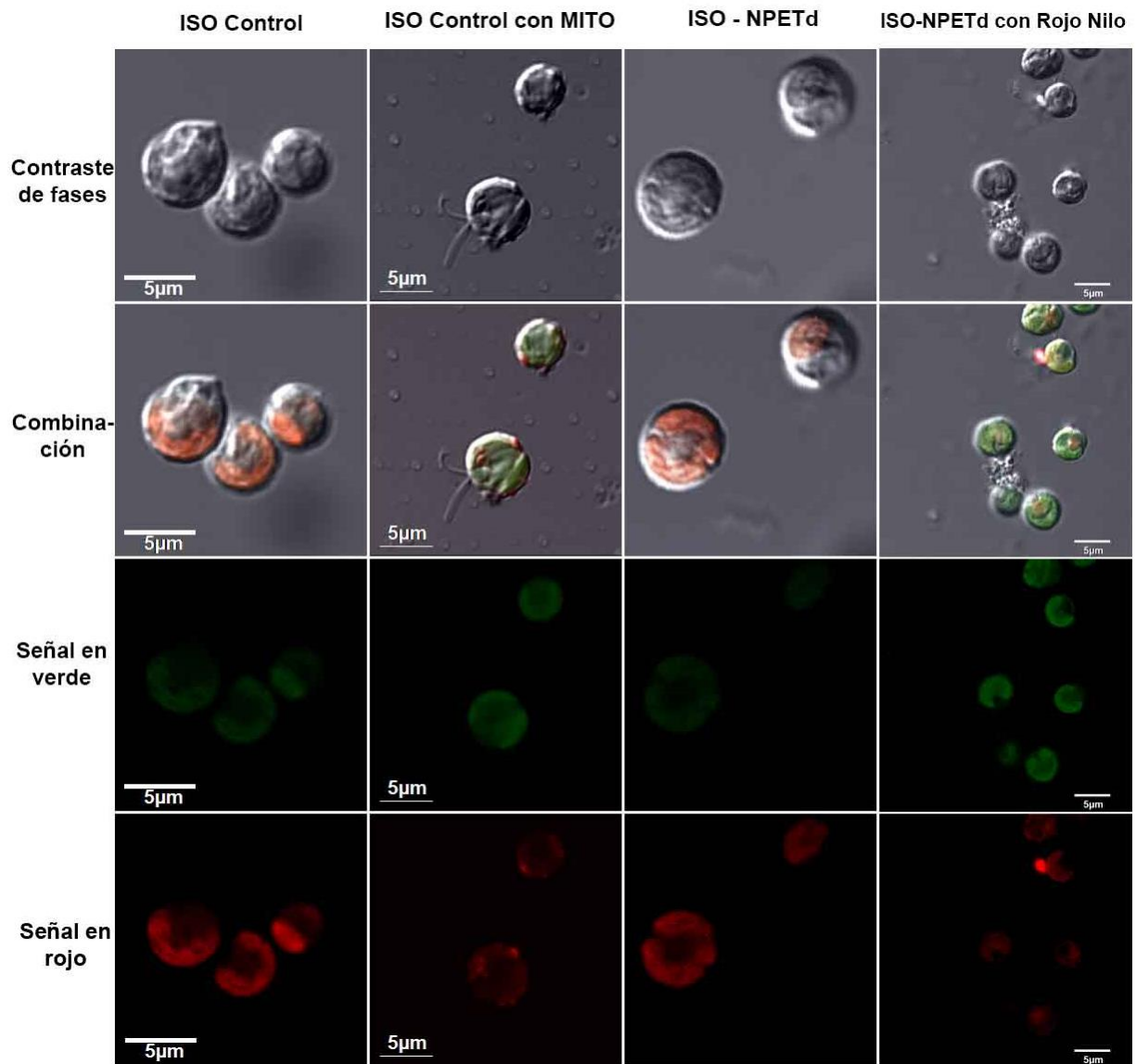


Figura 25. Microalga *Isochrysis Galbana* en presencia de NPETd mediante microscopía confocal. La señal verde corresponde a detectar la clorofila de microalga. La señal en rojo corresponde a detectar marcaje de mitocondria y NPETd teñidos de RN.

8 CONCLUSIONES

Para sintetizar, se observó que ambas metodologías, proceso de trituración mecánica y dilución de ácido, permiten obtener PET a escala nanométrica, pero con diferencias importantes en eficiencia, distribución y proporción de tamaños y escalas diferentes entre ellas. Por un lado, las NPETn, aunque mostraron partículas esféricas de 4-12 nm, la mayor distribución estaba entre 60-350 nm de diámetro hidrodinámico. Por otro lado, las NPETd mostraron un diámetro hidrodinámico de 50-200 nm, con una forma irregular, y con un tamaño promedio de 224 ± 46 nm (observado por TEM).

A partir del análisis de caracterización, se encontró que la estructura cristalina del PET no se ve afectada en ambas metodologías, sin embargo, las propiedades térmicas que se obtuvieron mediante TGA y DSC mostraron que sí existe una alteración en la estabilidad térmica para ambas metodologías.

En lo que respecta al análisis toxicológico, la tinción de Rojo Nilo resultó una buena herramienta de seguimiento para las NPET bajo microscopía óptica de fluorescencia, al trabajar en los experimentos de las células macrófagos *in vitro*. Sin embargo, en el caso de las microalgas, esto no permite un seguimiento similar, esto debido a que el marcador fluorescente pierde intensidad en la señal por la constante exposición a luz blanca, necesaria para el crecimiento de las microalgas; por lo que se debe buscar una alternativa al marcador fluorescente Rojo Nilo, si se desea continuar con este modelo *in vitro* para evaluar la toxicidad de nanoplásticos.

Congruente con la Hipótesis, de manera general y preliminar, la presencia de NPETn y NPETd mostró efectos en la viabilidad, tanto de macrófagos como de microalgas. Aunque los resultados en cada modelo celular mostraron diferencias asociadas a la concentración, no son suficientes para asociar si la metodología usada para la obtención de nanopartículas, influyo en esas diferencias; por lo que se requieren más estudios, como por ejemplo a nivel de expresión genética o análisis del estrés oxidativo y sus mecanismos de regulación y determinar alteraciones en el ciclo celular.

Como conclusión general, se puede decir que las NPETd, son el modelo de nanoplásticos que puede ser utilizado para los siguientes ensayos de toxicidad en modelos, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, debido a su fácil obtención, mayor cantidad y propiedades físico-químicas, cercanas al material de origen.

9 REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

- Abalde Alonso, J. E., Cid Blanco, A., Fidalgo Paredes, J. P., Torres Vaamonde, J. E., & Herrero López, C. (1995). Microalgas: Cultivo y aplicaciones. In *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. Universidade da Coruña. Servizo de Publicacións.
<https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Alimi, O. S., Farner Budarz, J., Hernandez, L. M., & Tufenkji, N. (2018). Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 52, Issue 4, pp. 1704–1724). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559>
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 62, Issue 8, pp. 1596–1605). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Barboza, L. G. A., Dick Vethaak, A., Lavorante, B. R. B. O., Lundebye, A. K., & Guilhermino, L. (2018). Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 133, pp. 336–348). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.047>
- Baudrimont, M., Arini, A., Guégan, C., Venel, Z., Gigault, J., Pedrono, B., Prunier, J., Maurice, L., Ter Halle, A., & Feurtet-Mazel, A. (2020). Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 3746–3755.
<https://doi.org/10.1007/S11356-019-04668-3>
- Bergami, E., Pugnali, S., Vannuccini, M. L., Manfra, L., Falieri, C., Savorelli, F., Dawson, K. A., & Corsi, I. (2017). Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquatic Toxicology*, 189, 159–169. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2017.06.008>
- Das, P., & Tiwari, P. (2019). Thermal degradation study of waste polyethylene terephthalate (PET) under inert and oxidative environments. *Thermochimica Acta*, 679, 178340.
<https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.178340>
- Ferreira, I., Venâncio, C., Lopes, I., & Oliveira, M. (2019). Nanoplastics and marine organisms: What has been studied? In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 67, pp. 1–7). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.006>
- Gambardella, C., Morgana, S., Ferrando, S., Bramini, M., Piazza, V., Costa, E., Garaventa, F., & Faimali, M. (2017). Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 250–257.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.07.036>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). *Production, use, and fate of all plastics ever made*. <http://advances.sciencemag.org/>

- Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P. Y., Gauffre, F., Phi, T. L., El Hadri, H., Grassl, B., & Reynaud, S. (2018). Current opinion: What is a nanoplastic? In *Environmental Pollution* (Vol. 235, pp. 1030–1034). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>
- Gómez Luna, L. M. (2007). *MICROALGAS: ASPECTOS ECOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS: Vol. XIX*.
- Gruenwald, G. (1998). *Thermoforming: A plastics processing guide* (2nd Editio). Technomic publishing.
- Ioakeimidis, C., Fotopoulou, K. N., Karapanagioti, H. K., Geraga, M., Zeri, C., Papathanassiou, E., Galgani, F., & Papatheodorou, G. (2016). The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. *Scientific Reports*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep23501>
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Johnson, J. E. (1959). X-ray diffraction studies of the crystallinity in polyethylene terephthalate. *Journal of Applied Polymer Science*, 2(5), 205–209. <https://doi.org/10.1002/app.1959.070020514>
- Karami, A., Golieskardi, A., Keong Choo, C., Larat, V., Galloway, T. S., & Salamatinia, B. (2017). The presence of microplastics in commercial salts from different countries. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep46173>
- Koelmans, A. A., Besseling, E., & Shim, W. J. (2015). Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. In *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 325–340). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_12
- Koelmans, A. A., Kooi, M., Law, K. L., & Van Sebille, E. (2017). All is not lost: Deriving a top-down mass budget of plastic at sea. *Environmental Research Letters*, 12(11). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa9500>
- Kosuth, M., Mason, S. A., & Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLoS ONE*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970>
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., & Mayes, A. G. (2017). A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep44501>
- Magri, D., Sánchez-Moreno, P., Caputo, G., Gatto, F., Veronesi, M., Bardi, G., Catelani, T., Guarnieri, D., Athanassiou, A., Pompa, P. P., & Fragouli, D. (2018). Laser ablation as a versatile tool to mimic polyethylene terephthalate nanoplastic pollutants: Characterization and toxicology assessment. *ACS Nano*, 12(8), 7690–7700. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01331>

- Marina, T., Cordone, G., Momo, F. (2019). Nada es lo que era: Cambios en las redes tróficas de los ecosistemas marinos antárticos. In *Marine Antarctic Food Webs: complexity, structure and stability* (pp. 27-30). <https://www.researchgate.net>
- Masmoudi, F., Fenouillot, F., Mehri, A., Jaziri, M., & Ammar, E. (2018). Characterization and quality assessment of recycled post-consumption poly(ethylene terephthalate) (PET). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 23307–23314. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2390-7>
- Miranda Vidales, J. M., Narváez Hernández, L., Tapia López, J. I., Martínez Flores, E. E., & Hernández, L. S. (2014). Polymer mortars prepared using a polymeric resin and particles obtained from waste pet bottle. *Construction and Building Materials*, 65, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.04.114>
- Mohammed Khalaf, E. (2016). Improvement of Chemical and Thermal Properties of Polyethylene Terephthalate (PET) by Using Multi-walled Carbon Nanotubes (MWCNTs). *International Journal of Materials Science and Applications*, 5(6), 297. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20160506.20>
- Parke, M. (1949). Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 28(1), 255–286. <https://doi.org/10.1017/S0025315400055302>
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. In *Environment International* (Vol. 146, p. 106274). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>
- Rodríguez-Hernández, A. G., Muñoz-Tabares, J. A., Aguilar-Guzmán, J. C., & 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>
- Singh, D., Malik, H. K., Gupta, C. K., & Singh, V. (2017). X-Ray Diffraction Studies for Identification of Polyethylene Terephthalate Fibres. *Indian Journal of Science and Technology*, 10(17), 1–4. <https://doi.org/10.17485/IJST/2017/V10I17/110232>
- Sjollema, S. B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H. A., Kraak, M. H. S., & Vethaak, A. D. (2016). Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquatic Toxicology*, 170, 259–261. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.12.002>
- Sun, X., Chen, B., Li, Q., Liu, N., Xia, B., Zhu, L., & Qu, K. (2018). Toxicities of polystyrene nano- and microplastics toward marine bacterium *Halomonas alkaliphila*. *Science of The Total Environment*, 642, 1378–1385. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.06.141>

- Tetu, S. G., Sarker, I., Schrameyer, V., Pickford, R., Elbourne, L. D. H., Moore, L. R., & Paulsen, I. T. (2019). Plastic leachates impair growth and oxygen production in *Prochlorococcus*, the ocean's most abundant photosynthetic bacteria. *Communications Biology* 2:1, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0410-x>
- Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J., & Vom Saal, F. S. (2009). Our plastic age. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1526, pp. 1973–1976). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0054>
- Thronksen, J. (1997). The Planktonic Marine Flagellates. In *Identifying Marine Phytoplankton* (pp. 591–729). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-012693018-4/50007-0>
- Velasco, L., Barros-Gómez, J., Ospina-Salazar, G., & Trujillo Arcila, C. (2009). Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* (Clon T-ISO). *Intropica*, 4(1), 93–99. <https://doi.org/10.21676/23897864.142>
- Wang, H., Li, Z., Liu, Y., Zhang, X., & Zhang, S. (2009). Degradation of poly(ethylene terephthalate) using ionic liquids. *Green Chemistry*, 11(10), 1568–1575. <https://doi.org/10.1039/b906831g>
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P., & Koelmans, A. A. (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11), 2490–2497. <https://doi.org/10.1002/ETC.1984>
- Ziegler-Heitbrock, L. (2014). Blood monocytes and their subsets in health and disease. In *Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases* (pp. 3–36). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1311-4_1