



Universidad de Concepción



FACULTAD DE CIENCIAS  
AMBIENTALES

# ANÁLISIS DE LA EXPOSICIÓN DE MICROPLÁSTICO EN *LUMBRICUS TERRESTRIS*

Habilitación presentada para optar al título de  
**Ingeniera Ambiental**

**CAMILA ROCÍO CIFUENTES BURGOS**

CONCEPCIÓN (CHILE), 2018



Universidad de Concepción



FACULTAD DE CIENCIAS  
AMBIENTALES

# ANÁLISIS DE LA EXPOSICIÓN DE MICROPLÁSTICO EN *LUMBRICUS TERRESTRIS*

Habilitación presentada para optar al título de  
**Ingeniera Ambiental**

**CAMILA ROCÍO CIFUENTES BURGOS**  
Profesor guía: **Patricia González Sánchez**

CONCEPCIÓN (CHILE), 2018

## **Agradecimientos**

Primero quisiera agradecer a la persona que estuvo desde el inicio del desarrollo de esta tesis, quien me apoyo durante todo este largo proceso, muchas gracias Anita Araneda por tu buena disponibilidad y paciencia, tu ayuda fue fundamental.

A mis profesoras Patricia González y Carolina Baeza, por guiarme en este proceso de tesis y brindarme su apoyo.

Al profesor Ricardo Barra, por facilitarme el laboratorio de biomarcadores para realizar el análisis enzimático.

Al profesor Hernán Montecinos, director del departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, quien me ayudo con las observaciones de las muestras en el microscopio de fluorescencia, por su ayuda y paciencia.

A Ivonne, Vale y Diana amigas y compañeras, por su apoyo y palabras de aliento.

A Pola y Susana quienes me ayudaron durante el desarrollo y elaboración de la presentación.

A toda mi familia por su apoyo durante todos estos años y preocupación, en especial a mi padre Humberto Cifuentes, que aunque ya no está con nosotras, sé que está feliz y orgulloso de este gran logro.

Y finalmente a todos aquellos a quienes no mencione y participaron en el desarrollo de esta tesis, MUCHAS GRACIAS.

## Índice general

	Pág.
RESUMEN .....	vi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. Pregunta de investigación.....	3
3. OBJETIVOS.....	3
3.1. Objetivo general. ....	3
3.2. Objetivos específicos.....	3
4.1. Plástico en el Mundo y en Chile. ....	4
4.2. Microplástico.....	6
5. METODOLOGÍA .....	14
5.1. Obtención del microplástico.....	14
5.2. Toma de muestras de suelo.....	14
5.3. Caracterización de parámetros físico-químicos de las muestras de suelos. 15	
5.3.1. Granulometría. ....	15
5.3.2. Porcentaje de humedad. ....	15
5.3.3. Materia orgánica. ....	16
5.4. Bioensayos.....	16
5.4.1. Bioensayo comportamiento de evasión.....	16
5.5. Análisis enzimático. ....	17
5.6. Distribución de microplástico por segmento en <i>Lumbricus terrestris</i> .....	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
6.1. Parámetros físico-químicos de las muestras de suelos.....	20
6.2. Bioensayos.....	20

6.2.1. Bioensayo de comportamiento.....	20
6.2.2. Análisis enzimático.....	22
6.2.3. Distribución de microplástico por segmento en <i>Lumbricus terrestris</i> . .....	23
7. CONCLUSIONES .....	27
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
9. ANEXOS .....	37



## Índice gráfico

Pág.

Gráfico 1. Comportamiento de evasión y desviación estandar..... 21

Gráfico 2. Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en los tejidos de buche/molleja, intestino anterior y medio de *Lumbricus terrestris*. ..... 22

Gráfico 3. Número de partículas de microplástico promedio, por segmento de *Lumbricus terrestris*. ..... 24



## Índice tablas

	Pág.
Tabla 1. Bioensayos realizados para determinar los efectos toxicológicos del microplástico. ....	10
Tabla 2. Características de la muestra obtenida del predio agrícola de cultivos orgánicos.....	20



## Índice Figuras

	Pág.
Figura 1. Mapa global con cada país de acuerdo al total estimado de los residuos plásticos mal manejados [millones de toneladas métricas (MMT)] generados en 2010 por las poblaciones que viven a 50 km de la costa. ....	4
Figura 2. Definición de tamaño de los plásticos según varios autores. ....	6
Figura 3. Efectos de macro, meso, micro y nanoplástico. ....	8
Figura 4. Bioensayo, comportamiento de evasión.....	17
Figura 5. Secciones consideradas de la lombriz de tierra, <i>Lumbricus terrestris</i> ...	19
Figura 6. Imágenes de microplástico en <i>Lumbricus terrestris</i> expuesta a 2,5% p/p, molleja sin filtro de luz azul (a) y con filtro de luz azul (b), intestino medio (c) Intestino posterior (d). ....	25
Figura 7. Imágenes de microplástico en <i>Lumbricus terrestris</i> expuesta a 5% p/p, intestino anterior sin filtro de luz azul (a) y con filtro de luz azul (b), intestino medio (c) e intestino posteriorm (d). ....	26
Figura 8. Imágenes de microplástico en <i>Lumbricus terrestris</i> expuesta a 7% p/p, molleja sin filtro de luz azul (a) y con filtro de luz azul (b), intestino medio (c) e intestino posterior (d). ....	26

## RESUMEN

Los efectos de exposición al microplástico han sido ampliamente reportados en organismos acuáticos, evidenciando cambios morfológicos, comportamiento y reproductivos. No obstante, existe escasa o nula evidencia en sistemas terrestres y edáficos. En este contexto, el objetivo del estudio fue evaluar los efectos de exposición al microplástico, utilizando como bioindicador la especie *Lumbricus terrestris*, expuesta a diferentes concentraciones de microplástico (C1=2,5%; C2=5% y C3=7% p/p). Se realizó bioensayo de evasión por 48 horas con 6 ejemplares en cada contenedor, cuyo interior se dividió el suelo con presencia y ausencia de microplástico. Finalizado el experimento, se hizo disección del tracto gastrointestinal de la lombriz de tierra: buche/molleja, intestino anterior y medio, posteriormente, se utilizó la acetilcolinesterasa (AChE) como biomarcador para medir la actividad enzimática. Paralelamente se realizó un bioensayo de ingesta con las mismas concentraciones del experimento anterior en placas petri, dejando un ejemplar por placa, después de 48 horas, se observó a través de una lupa estereoscópica y microscopio de fluorescencia la distribución del microplástico en los diferentes segmentos de la lombriz de tierra. Los resultados obtenidos en 1er ensayo de evasión, indicaron ausencia de preferencia por ningún tipo de suelo, sin embargo, las lombrices de tierra al desplazarse perdieron la mucosidad superficial, provocándoles quemaduras y lesiones en su cuerpo, esto último, pudo verse reflejado en el aumento de los niveles enzimático de la AChE, lo que no estuvo relacionado directamente por la ingesta de microplástico, si no, que éste actuaría como agente estresor físico externo. Los resultados del 2do bioensayo evidenciaron que, en todos los segmentos de la lombriz de tierra había presencia de microplástico, con un mayor porcentaje de éste en el intestino posterior. De acuerdo a los resultados de este estudio exploratorio se concluye, que las concentraciones utilizadas fueron altas, por lo que no se logró diferenciar la ingesta del microplástico y los efectos de exposición a través de la AChE en la lombriz de tierra. Por lo que se sugiere el uso de una menor concentración de microplástico en organismos edáficos en futuras investigaciones.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las partículas sintéticas resultantes de menos de 5 mm, que se acumulan en el medio ambiente, se definen comúnmente como microplásticos (Arthur y Baker, 2009), los cuales pueden ser primarios o secundarios. Los primarios se refiere a las que se producen con ese tamaño como materia prima para la fabricación de productos, entre los que destacan los de cuidado personal como cremas, pastas de dientes, gel de ducha, etc. los cuales son arrastrados hacia el mar, por las aguas residuales que descargan en los ríos. (Cole et al., 2011; Fendall y Sewell, 2009). Muy por el contrario los secundarios se generan por la fragmentación del plástico, lo cual se produce por la acción tanto foto como termo oxidativa y la acción mecánica sobre la basura plástica que se encuentra en el medio ambiente.

Estas partículas de microplástico se han estudiado en una variedad de ecosistemas marinos como en los océanos (Andray, A. L. et al., 2011; Jambeck, J. R. et al., 2015), estuarios (Zhao et al., 2014), cuerpos de agua dulce (Biginagwa et al., 2016; Cózar et al., 2014; Law y Thompson, 2014). Además han sido muestreados en playas (Young, A. M. et al., 2016; Lee, J. et al., 2015), sedimentos marinos (Kedzierski et al., 2016; Galgani et al., 2000; Van Cauwenberghe et al., 2015), así como en la biota marina (Wesch et al., 2016; Desforges et al., 2015).

En estudios realizados en algas, se ha observado que representan una vía de ingreso de microplástico hacia los organismos bentónicos ya que se adhiere a la superficie de esta (Gutow, L. et al., 2016) y provoca efectos en el crecimiento (Sjollema et al., 2016; Besseling et al., 2014), en *Mytilus edulis* y gusanos marinos existen efectos a concentraciones cercanas a 0.8 partículas/L y 23,4 kg/m<sup>2</sup> de partículas (Van Cauwenberghe, L. et al., 2015), en un invertebrado de mayor tamaño como lo es el Cangrejo Violinista, se pudo apreciar cambios a una densidad de 108 y 1000 partículas de microplástico mg/kg de sedimento seco. (Brennecke D. et al., 2015).

Al comienzo los estudios que se han realizados de microplásticos se basaban principalmente en las consecuencias que conllevaba en el organismo la ingesta de estas partículas, pero con el avance de las investigaciones se pudo observar que debido a las propiedades hidrofóbicas de las partículas de plástico en el mar pueden aumentar las concentraciones de los contaminantes orgánicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y los PCBs en la superficie de los invertebrados marinos (Teuten et al, 2009, 2007;. Wurl y Obbard, 2004). Estos pueden desorber cuando las partículas de microplástico ingeridos pasan a través del sistema digestivo de los invertebrados marinos y luego se acumulan en sus tejidos (Endo et al., 2005).

A pesar de esto, la gran abundancia de microplástico que se encuentra en el sedimento marino, es desconocida, porque existe una gran variabilidad entre las regiones geográficas y hábitats costeros. Esta abundancia fluctúa entre 8 partículas/Kg de sedimento a 2175 partículas/Kg de sedimento. Pero se observa que las altas concentraciones de microplástico, se encuentran comúnmente cerca de los asentamientos urbanos y zonas costeras altamente pobladas. (Ivar do Sul y Costa, 2014).

En cuanto a la información existente sobre los efectos del microplástico en organismos terrestres es muy escasa. Hasta la fecha existen escasos estudios disponibles los cuales utilizaron como bioindicador lombrices (Lwanga E. H. et al., 2016, 2017; Hodson et al., 2017; Rodriguez-Seijo et al., 2017; Matthias C. Rilling et al., 2017) donde se evidenció, por ejemplo, que las lombrices pueden ser agentes importantes de transporte de microplástico lo que tiene implicancias para la posterior disponibilidad a otros organismos terrestres y que provoca daños al intestino y en las respuestas del sistema inmune. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, no se observaron efectos en isópodos terrestres (KokaljA J. et al., 2017), al exponerlos durante 14 días a una concentración de 4 mg g<sup>-1</sup> peso seco.

## 2. Pregunta de investigación.

El microplástico presente en el suelo causa efectos adversos en lombrices de tierra, organismos importantes para la estructura y dinámica del suelo, por lo cual, ¿Las lombrices podrían ser un buen bioindicador de microplástico en suelos?

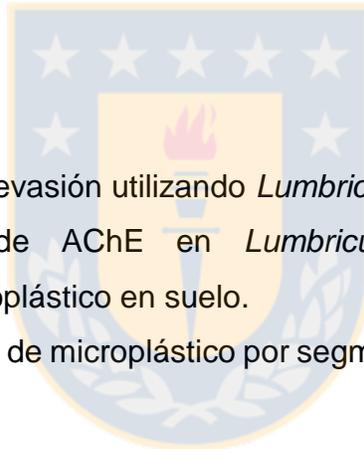
## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general.

- Evaluar los efectos de exposición del microplástico a diferentes concentraciones, en anélidos de la especie *Lumbricus terrestris*.

### 3.2. Objetivos específicos.

- Evaluar el porcentaje de evasión utilizando *Lumbricus terrestris*.
- Evaluar la actividad de AChE en *Lumbricus terrestris*, a diferentes concentraciones de microplástico en suelo.
- Determinar la distribución de microplástico por segmento en *Lumbricus terrestris*.

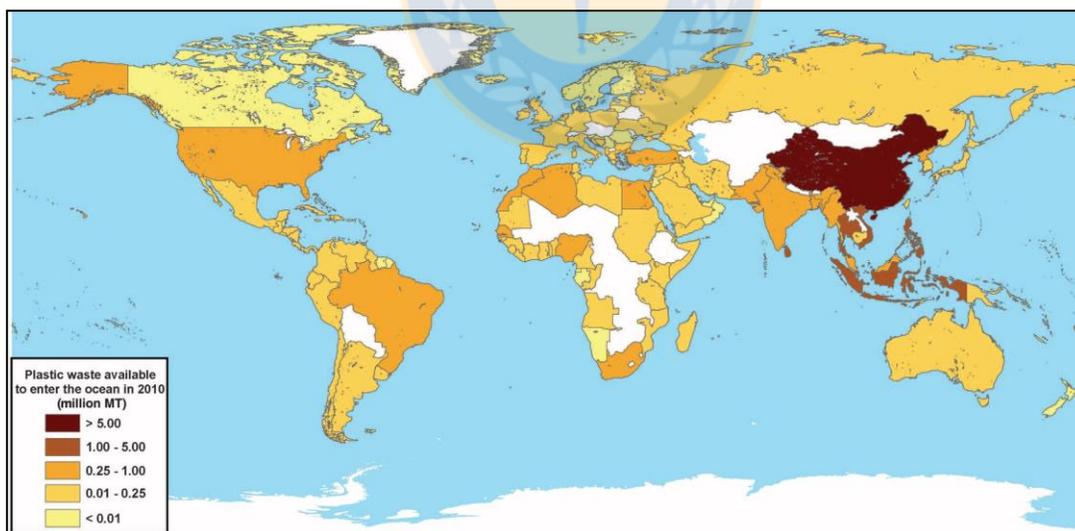


## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Plástico en el Mundo y en Chile.

Antes de abordar la problemática entorno al microplástico, es necesarios conocer la situación existente en el mundo y en Chile con respecto al plástico, debido a que es una de las principales fuentes (microplástico secundario), en los ecosistemas terrestres por la mala gestión de estos desechos.

De acuerdo a estimaciones realizadas por Jambeck et al., (2015), la cantidad de plástico que puede ingresar a los océanos producto de una mala gestión en un solo país, van desde los 1.1 toneladas métricas a 8.8 millones de toneladas métricas por año. La figura 1 presenta un mapa global con las estimaciones de residuos plásticos mal manejados, en los que destaca China con 1,32-3,53 MMT/año, Indonesia 0,48-1,29 MMT/año y Filipinas con 0,28-0,75 MMT/año. En Chile por su parte, se estimó que la cantidad de residuos plásticos mal manejados van desde los 0,01 MMT a 0,25 MMT.

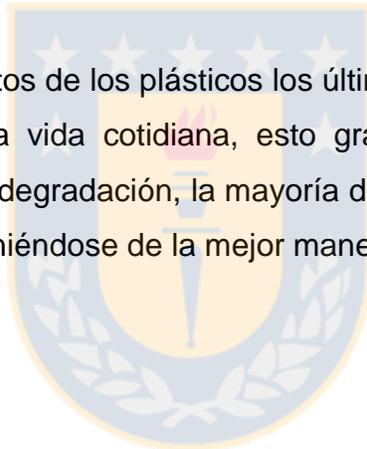


**Figura 1.** Mapa global con cada país de acuerdo al total estimado de los residuos plásticos mal manejados [millones de toneladas métricas (MMT)] generados en 2010 por las poblaciones que viven a 50 km de la costa.

Fuente: Jambeck et al., 2015.

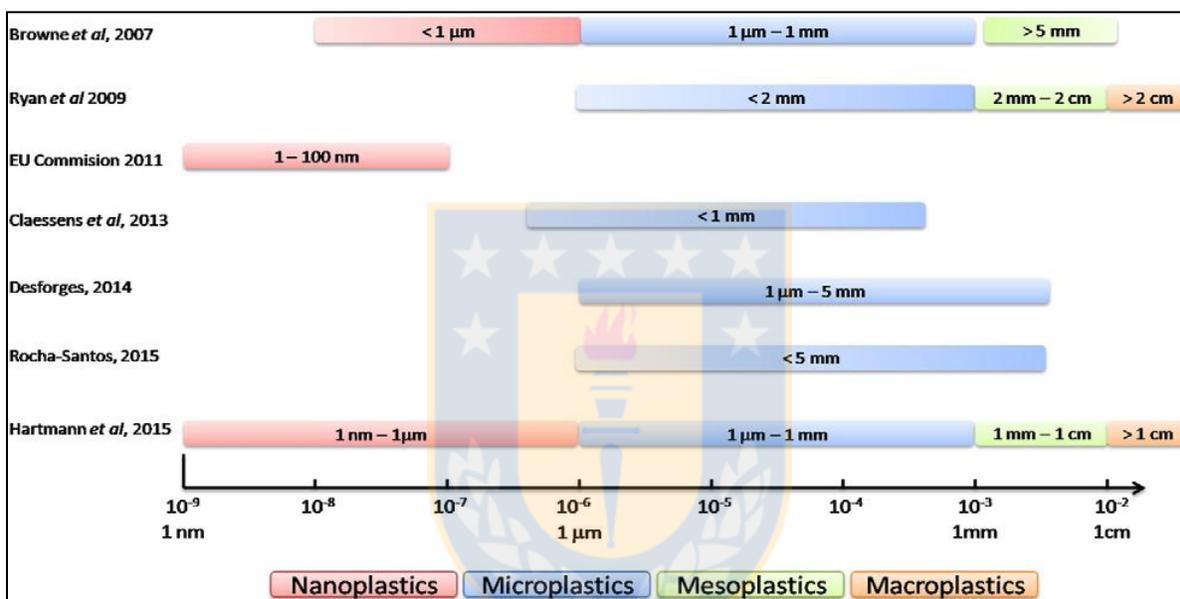
De acuerdo a lo descrito por Horton A. A et al., (2017), en el año 2014 la producción anual de plástico fue de 311 millones de toneladas (Horton, Alice A. et al., 2017) y se estima que para el año 2050 esto podría aumentar en 33 mil millones de toneladas (Rochman et al., 2013). Dentro de la producción de plástico los empaques son los más producidos con un 39.5% de producción total, materiales de construcción 20.1%, componentes automotrices 8.6%, aparatos electrónicos 5.7% y materiales agrícolas 3.4%, el resto incluye productos electrodomésticos y equipamiento deportivo (Plastics Europe, 2015). Muchos de los productos plásticos tienen una vida útil relativamente corta, como los materiales de embalaje de un solo uso, por lo que terminan en la basura o en el ambiente. Estos representan entre un 10 - 15% en peso de los residuos sólidos urbanos (RSU) dependiendo del lugar.

La preocupación por los efectos de los plásticos los últimos años ha ido en aumento debido a su gran uso en la vida cotidiana, esto gracias a las propiedades de durabilidad y resistencia a la degradación, la mayoría de estos son de un solo uso y luego se desechan, no disponiéndose de la mejor manera.



## 4.2. Microplástico.

Una definición clara de microplástico no existe, sin embargo, se puede encontrar una gran variedad de definiciones de tamaño de los plásticos propuesto por varios autores, los que van desde nanoplastico a macroplástico tal como se muestra en la figura 2. Para efectos de este trabajo se utilizó la definición sugerida por Hartmann et al., 2015, la cual caracteriza todos los tamaños que se pueden encontrar del plástico.



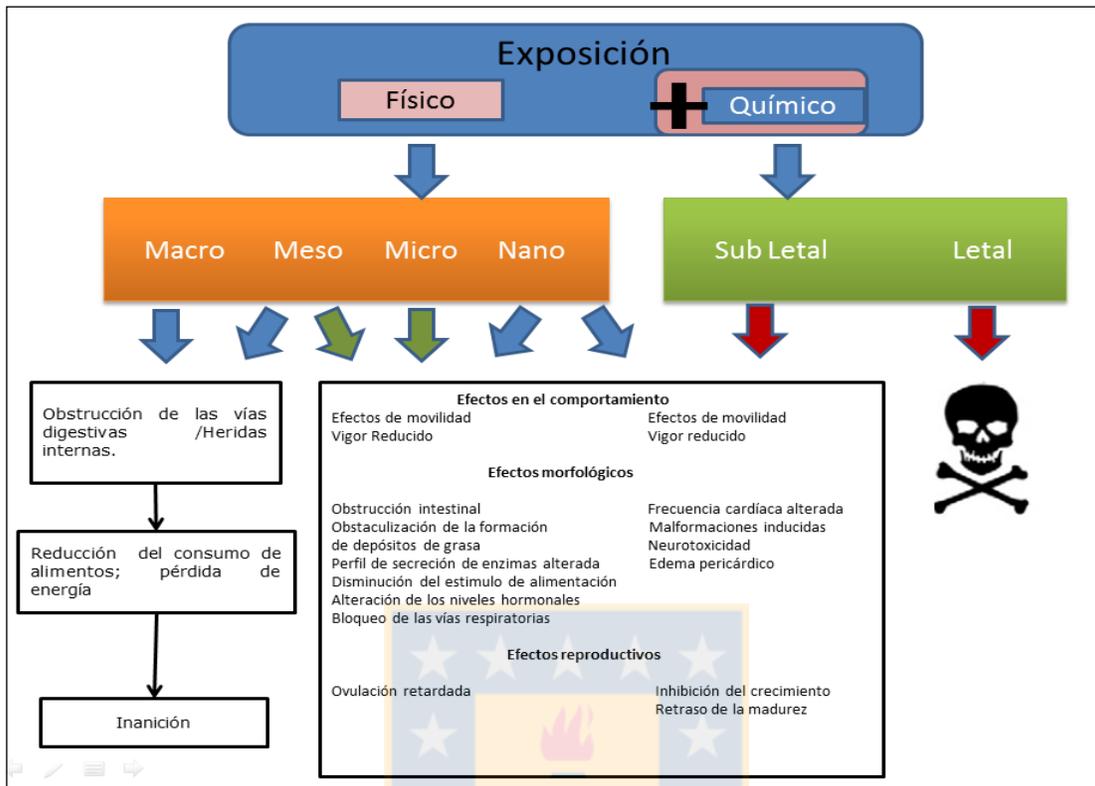
**Figura 2.** Definición de tamaño de los plásticos según varios autores.

Fuente: Rocha-Santos 2015, Hartmann et al., 2015, Browne et al., 2007, Ryan et al., 2009, EUCommision 2011, Claessens et al., 2013, Desforges et al., 2014.

Los microplásticos pueden provenir de diversas fuentes, por ejemplo, son usados en productos de cuidado personal, lo que en algunos casos ha sustituido a los ingredientes naturales. Otra fuente de microplástico son los pellets plásticos utilizados como materia prima de los productos plásticos, además de los que se forman debido a que pasan por diversos procesos tanto físicos como químicos antes de transformarse en las pequeña partículas conocidas como microplástico, estos procesos pueden ser foto y termo-oxidativos, impactos mecánicos como la acción de las olas y la abrasión mecánica, entre otros (Andrady A, 2011).

Existen diversos estudios de los efectos que podrían causar la fragmentación de los polímeros en diferentes tamaños en ecosistemas acuáticos, principalmente los fragmentos más pequeños ya que por su tamaño hace que estén disponibles para la interacción con la biota marina en diferentes niveles tróficos, donde los organismos son vulnerables a la exposición (Wright et al., 2013), existiendo un riesgo potencial a causar daños (Galloway 2015; Koelmans et al., 2015).

En la fig. 3 se ilustran algunos de los efectos potenciales que se han observado a través de los diferentes bioensayos realizados con estos polímeros. Entre los efectos producidos por los microplásticos están: i) alteración en el comportamiento, lo que se manifiesta en la movilidad del organismo, ii) tiene efectos en la morfología lo que provoca obstrucción intestinal, obstaculización de la formación de depósitos de grasa, disminución del estímulo de alimentación, alteración de los niveles hormonales y bloqueo de las vías respiratorias, iii) efectos en la reproducción. Por otra parte cuando los microplásticos están asociados a contaminantes presentes en el medio ambiente, los efectos pueden llegar a ser letales, ya que son propensos a adsorber los contaminantes orgánicos a base de agua (Teuten et al., 2007). Por lo que estudios indican que pueden actuar como vía para la introducción de toxinas a la cadena alimentaria (Teuten et al., 2009).



**Figura 3.** Efectos de macro, meso, micro y nanoplastico.

Fuente: Adaptado de Lambert et al., 2014

Una forma de determinar el efecto de microplástico en diferentes organismos es a través de bioensayos. A continuación se presentan estudios asociados a esta problemática.

### 4.3 Bioensayos.

Existe una gran cantidad de estudios que se han realizado para ver los efectos de los microplásticos en diferentes organismos de ambientes acuáticos, donde el tamaño de las partículas de microplástico utilizadas varía del nanoplástico  $10^{-6}$  a las 250 micras. Entre los bioensayos se encuentran los realizados en algas, donde se demostró que el microplástico se adhiere en la superficie de esta, lo que representa una vía de ingreso desde el agua a los organismos bentónicos marinos (Gutow, L. et al., 2016), en otro estudio se realizaron pruebas para ver los efectos que podría tener sobre microalgas (*Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Chorella vulgaris*), lo que se determinó por fluorometría y citometría, en donde se concluyó que no tenía efecto sobre la fotosíntesis, sin embargo, el crecimiento se vio afectado negativamente (Sjollema et al., 2016; Besseling et al., 2014). Además, en estudios realizados en *Mytilus edulis* y gusanos marinos *Arenicola*, no se observaron efectos en concentraciones de microesferas de poliestireno de 110 partículas/ml de agua de mar y 110 partículas/gr de sedimento, respectivamente (Van Cauwenberghe, L. et al., 2015). Otro ejemplo es el del Cangrejo Violinista, un invertebrado de mayor tamaño, en el que se pudo apreciar cambios a una densidad de 108 y 1000 microplástico mg/kg de sedimento seco. (Brennecke D. et al., 2015). Cabe destacar también los estudios realizados en comunidades de invertebrados (Setälä, O. et al., 2016), peces arcoíris (Wardrop, P. et al., 2016), Daphnias (Rehse, S. et al., 2016 y Besseling, E. et al., 2014), entre otros.

Considerando los estudios que existen disponibles en literatura, los efectos en organismos acuáticos están ampliamente estudiados, no así en organismos terrestres donde existen pocos estudios, como los detallados en la tabla 1.

**Tabla 1.** Bioensayos realizados para determinar los efectos toxicológicos del microplástico.

Organismo	Microplástico utilizado	Tamaño de las partículas	Duración y tipo de bioensayo	Resultados	Referencia
Lombriz <i>Lumbricus terrestris</i>	Polietileno de baja densidad (LDPE)	<150 micras	4 días (Ingesta) 14 días (Agudo) 28 días (Crónico)	A una concentración de 28%p/p en la capa superficial del suelo dio como resultado un aumento de la tasa de ingestión y una disminución del peso corporal, pero no se observó ningún efecto sobre la reproducción, por otra parte, a una concentración del 60% p/p causa un mayor índice de mortalidad en un periodo de 60 días.	Lwanga, E. H. et al., 2016
Lombriz <i>Lumbricus terrestris</i>	Polietileno de baja densidad (LDPE)	<400 micras	14 días (Caracterización de los túneles)	La alta tasa de incorporación biogénica de microplásticos en las paredes de las madrigueras causa un riesgo de lixiviación, además de tener implicaciones para la posterior disponibilidad a otros organismos terrestres y para el transporte de contaminantes orgánicos asociados al plástico en el suelo.	Lwanga, E. H. et al., 2017
Isópodos terrestres,	Microplásticos de un	<183 micras	14 días (Agudo)	Con una concentración de 4 mg g <sup>-1</sup> peso seco, al contrario de lo que esperaban, no se observaron	KokaljA. J. et al., 2017

<i>Porcellio scaber</i>	limpiador facial y bolsa de plástico			efectos en las condiciones de exposición. Por lo que concluyeron que 14 días de exposición no son muy peligrosos para los isópodos.	
Lombriz <i>Lumbricus terrestris</i>	Bolsas de HDPE		28 días	Se observó que la desorción de Zn era mínima en ambos casos expuestos, lo que sugiere que el microplástico podría aumentar la biodisponibilidad de Zn en los mesocosmos que contienen 0,35% en peso de microplástico, además no hubo evidencia de acumulación de Zn, mortalidad o cambio de peso. La digestión de las lombrices demostró que no retienen microplásticos en el intestino lo que indica que podrían actuar como vectores para aumentar la exposición del metal a las lombrices, pero que es poco probable que el riesgo asociado sea significativo para los metales esenciales, como el Zn, que están bien regulados por los procesos metabólicos.	Hodson et al., 2017
Lombriz <i>Eisenia andrei</i>	Polietileno (PE)	Entre 1000 y 250 micras	28 días (análisis histopatológicos, de	No se registraron efectos significativos sobre la supervivencia, reproducción y el peso final después de la exposición. Sin embargo, en el análisis histopatológico del intestino se observaron	Rodriguez-Seijo et al., 2017

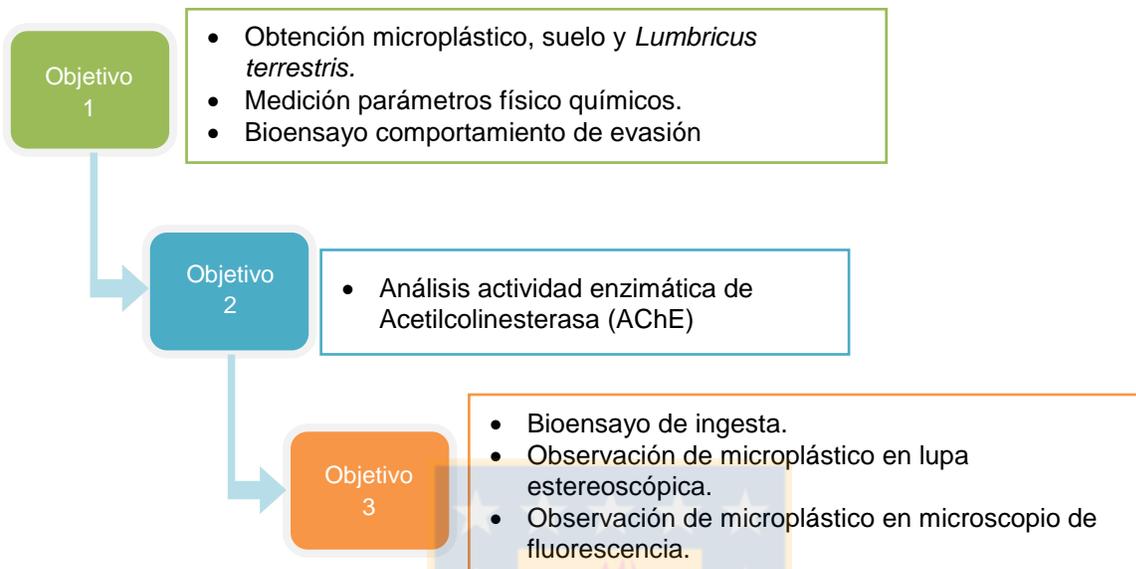
			microscopía y FTIR) 56 días (ensayo de reproducción)	evidencias de daños y respuestas del sistema inmune.	
Lombriz <i>Lumbricus terrestris</i>	Polietileno (PE)	Entre 710-850 µm, 1180-1400 µm, 1700-2000 µm y 2360-2800 µm	21 días	Las lombrices pueden ser importantes agentes de transporte de microplástico en los suelos, incorporándolo por las madrigueras, egestión y la adherencia en la mucosidad de la lombriz, lo que hace posible la llegada de microplástico a aguas subterráneas.	Matthias C. Rillig et al., 2017

Además de lo descrito en la tabla 1, Lwanga et al., (2017) realizó un estudio que proporcionó la primera evidencia de transferencia de microplástico en la cadena trófica donde las concentraciones de estas partículas aumentaron desde el suelo ( $0,87 \pm 1,9$  partículas/g), hasta las lombrices de tierra ( $14,8 \pm 28,8$  partículas/g), hasta las heces de pollo ( $129,8 \pm 82,3$  partículas/g), es por esto que resulta de suma importancia ahondar más en este tipo de estudios ya que aquí se encuentran organismos importantes, como es el caso de la lombriz de tierra, cuya actividad genera beneficios para la estructura y dinámica del suelo.

Es por esto que se utilizó el ensayo de comportamiento, en el presente estudio para evaluar la calidad del suelo y medir la posible toxicidad de los contaminantes de manera rápida, como una primera herramienta de evaluación, el cual está estandarizado para lombrices por Loureiro et al., (2005), principalmente para ver los efectos de pesticidas. Para esto se utilizan los siguientes criterios: si el 50% de los organismos se encuentran en el suelo contaminado, se considera que no muestran preferencia por ningún tipo de suelo y que dicho suelo es un hábitat adecuado. Por otra parte, si el porcentaje de lombrices en el suelo contaminado es del 20% se considera que el suelo tiene efecto sobre los organismos y, por lo tanto, que es tóxico o de baja calidad (Hund et al., 2003; Hund et al., 2005; Ricardo et al., 2010). En los ensayos de toxicidad por lo general se acompañan de mediciones de biomarcadores, esto para tener una idea más acabada de los potenciales efectos de exposición frente a una o más sustancias tóxicas, lo que se ve reflejado en las respuestas a nivel molecular, biológica, fisiológico o histológico, a una o más sustancias químicas (Chapman et al., 2001). Tal como menciona Ossana (2011), existen biomarcadores de distintos tipos (de exposición, de efecto, de sensibilidad), en el presente estudio se utilizara un biomarcador que integra la exposición química y efectos biológicos, la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que se ha utilizado en diversos estudios para evaluar la exposición a pesticidas y metales pesados como los realizado por Morcillo S. M. et al., (2013); Velki M. et al., (2014); Mekahlia M. N. et al., (2015) y Aráneda A. et al., (2016).

## 5. METODOLOGÍA

A continuación se presenta un esquema conceptual de la metodología utilizada:



### 5.1. Obtención del microplástico.

Se recolectaron vasos de plumavit, bombillas de plástico, pellets de baja densidad y botellas desechables (PET), los cuales fueron lavados y secados a temperatura ambiente, para posteriormente llevarlos a la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT), lugar en el cual se molieron utilizando el molino de corte SM 300 (Retsch) el que a una velocidad de 1500 rpm permitió obtener partículas de un tamaño aproximado de 250 micrómetros.

### 5.2. Toma de muestras de suelo.

Se tomaron muestras de suelo de predio agrícola de cultivos orgánicos de la ciudad de Chillán. Las muestras fueron extraídas de la capa superficial (15 cm aprox) del suelo y almacenadas, para posteriormente realizar una caracterización de los parámetros físico-químicos.

### **5.3. Caracterización de parámetros físico-químicos de las muestras de suelos.**

#### **5.3.1. Granulometría.**

A las muestras se les realizó un análisis granulométrico utilizando un analizador de partículas por difracción láser Mastersizer 3000, el cual proporciona distribuciones rápidas y precisas en especial para sedimentos finos que son más complejos de analizar utilizando el método físico del tamizado, ya que tiene un rango de medida más amplio. Para lo cual se utilizó aproximadamente 2 gr y se disolvió con un poco de agua destilada en un vaso precipitado para luego proceder a analizarlo, esto se realizó en triplicado.

#### **5.3.2. Porcentaje de humedad.**

Una muestra representativa del suelo a evaluar, se procedió a pesar la muestra húmeda más un recipiente previamente tarado. Luego se colocó el conjunto dentro del horno durante 48 horas, a una temperatura de  $110^{\circ} \pm 5^{\circ}$  C. Una vez transcurridas las 48 horas se determinó el peso del recipiente con la muestra seca (NCh 1515 Of. 79).

Se midió mediante el método tradicional, secado a horno donde la humedad de un suelo es la relación expresada en porcentaje entre el peso del agua existente en una determinada masa de suelo y el peso de las partículas sólidas, o sea:

$$w = ( Ww / Ws ) * 100 \quad (1)$$

Dónde:

w = contenido de humedad expresado en %

W w = peso del agua existente en la masa de suelo

Ws = peso de las partículas sólidas

### **5.3.3. Materia orgánica.**

Para determinar la cantidad de materia orgánica se utilizó el método por ignición, para esto se utilizaron 5 gr de la muestra de suelo seca, la cual fue colocada en 3 crisoles y luego se calentó en un horno a 550°C, durante 6 horas. Luego se colocaron en un desecador y posteriormente se pesaron. El contenido de materia orgánica se calculó como la diferencia entre el peso inicial y final de la muestra dividido por el peso de la muestra inicial multiplicado por 100% (BOYLE, J. 2002. Inorganic geochemical methods in paleolimnology)

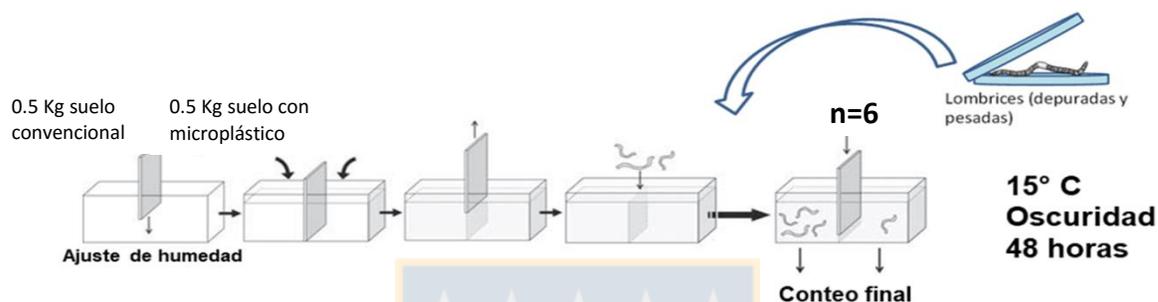
### **5.4. Bioensayos.**

#### **5.4.1. Bioensayo comportamiento de evasión.**

El Bioensayo de comportamiento de evasión se realizó a partir de una adaptación del establecido por la Organización Internacional de Normalización (ISO 2008) que ha sido usado también por autores como Natal-da-Luz et al., 2004, Van Gestel et al., 2008, Araneda A. et al., 2016, entre otros.

El organismo bioindicador utilizado fue la lombriz terrestre, *Lumbricus terrestris*, las cuales se obtuvieron de un proveedor en Concepción, región del Biobío, de estas fueron seleccionadas para la prueba aquellas con un clitelo bien desarrollado y con un peso mayor a 0,5 gr. Se utilizaron contenedores de plástico de 20 cm x 12 cm x 10 cm, los cuales se subdividieron en dos secciones mediante un tabique de cartón y se depositaron en ellas 500 gr. en cada sección. La primera sección era suelo sin microplástico la que se consideró como la sección control, en cambio la segunda sección el suelo estaba con una mezcla de 4 tipos de microplásticos en igual proporción (vasos de plumavit, bombillas, botellas de plásticos PET y pellets de baja densidad). Las mezclas se prepararon en base a las 3 concentraciones de estudio 2,5; 5 y 7% p/p, esto se determinó en base a pruebas previas. El tabique fue removido y en la parte central se colocaron 6 lombrices, a su vez el contenedor se cubrió con

papel de aluminio con pequeños agujeros para permitir aireación y para evitar que las lombrices escapen. El porcentaje de humedad en cada lado se ajustó al comienzo de los bioensayos a un 25%, además se mantuvieron a una temperatura de  $15 \pm 2^\circ\text{C}$  en la oscuridad durante 48h. Cada ensayo se realizó en triplicado (figura 4), obteniéndose un total de 9 ensayos. Para ver si existía una relación dosis respuesta fue necesario pesar cada uno de los organismos antes y después del bioensayo.



**Figura 4.** Bioensayo, comportamiento de evasión.  
Fuente: ISO 1993; ISO 1998

Una vez transcurridas las 48 horas se colocó el tabique de separación, para comenzar con el conteo de individuos por sección. Los individuos encontrados en la línea divisoria del contenedor fueron asignados en base a la posición de la cabeza (De Silva y Van Gestel, 2008).

### 5.5. Análisis enzimático.

Tal como se mencionó anteriormente, se recomienda utilizar biomarcadores para tener una idea más acabada de los posibles efectos de exposición en los ensayos de comportamiento de evasión, por lo que se evaluó el biomarcador de exposición acetilcolinesterasa (AChE) en las lombrices del bioensayo de evasión. De acuerdo a lo descrito por Ossana (2011) los biomarcadores de exposición indican que el contaminante al cual se expuso ingresó en el organismo, no entregan información de las posibles consecuencias de la exposición.

Las lombrices de tierra fueron descongeladas para los análisis y cada una fue diseccionada por una incisión longitudinal en la línea media dorsal del clitelo hacia la boca, de donde se retiraron el buche/molleja, intestino anterior y medio de manera de no pasar a llevar el tejido epitelial, los que posteriormente fueron lavados cuidadosamente y colocadas en tubos Eppendorf de 2,5 ml, a los que se le añadieron 250 µl de solución tampón sodio fosfato (0,1 M; pH 8,2). Se maceraron con un mortero de vidrio y el tejido se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 30 min (Hettich, Mikro 220 R, Tuttlingen, Alemania). Se separó el plasma del resto de la mezcla y se almacenaron en el ultra-congelador a -80 °C hasta un análisis posterior.

La actividad de la enzima acetilcolinesterasa se determinó con el método Ellman et al., (1961), la cual se adaptó al formato de microplaca Wheelock et al.,(2005). La reacción enzimática se realizó en microplacas de 96 pozos con fondo plano, a cada pozo se le agregó 50 µl de muestra sin diluir, 130 µl de tampón fosfato de Na 0,1 M (pH=8) que contiene de ácido 5,5 'ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB). Después de 5 minutos se añadieron 20 µl de acetiltiocolina yodada 60 mM. (AcSCh) a la mezcla para la reacción y luego de 10 minutos se leyó la absorbancia a 412 nm durante 10 minutos (en intervalos de un minuto) a 22°C usando un lector de microplacas Synergy HT (Biotek®, Winooski, VT, EEUU). Todas las reacciones se realizaron por triplicado y con espacios en blanco (medio de reacción sin una muestra). Además, la cantidad de proteínas se calculó sobre la base de la curva de calibración con albúmina de suero bovino usando el método de Biuret (Gornall et al., 1949).

#### **5.6. Distribución de microplástico por segmento en *Lumbricus terrestris*.**

Para determinar la distribución del microplástico se realizó primeramente un bioensayo de ingesta de microplástico en la lombriz de tierra *Lumbricus terrestris* para lo cual se prepararon concentraciones de 2,5%, 5% y 7% en relación a los 138 gr de suelo con los que realizaron los bioensayos. Estos se realizaron en triplicado en placas petri de 12 cm de diámetro y 2,5 de alto. En cada placa se le colocó un

organismo que previamente fue lavado con agua mili-q y pesado, durante un periodo de 48 horas, transcurrido ese tiempo se retiraron los organismos, se limpiaron y se volvieron a pesar. Finalmente fueron almacenadas a -80°C en un ultra-congelador (Biobase, BXC-86 HL-340, Jinan, China) para su posterior análisis.

Para el análisis de las lombrices de tierra, se realizó un conteo de microplástico por órgano, en el cual se consideraron los siguientes órganos: el buche/molleja, intestino anterior, intestino medio, intestino posterior, recto y las deyecciones como se muestra en la figura 5. Para esto las lombrices fueron descongeladas y diseccionadas por una incisión longitudinal en la línea media dorsal desde la boca hacia el recto con la ayuda de una lupa estereoscópica, de manera que el contenido de cada órgano se quedara en su lugar para realizar el conteo de microplástico.



**Figura 5.** Secciones consideradas de la lombriz de tierra, *Lumbricus terrestris*.

Fuente: Elaboración propia.

Además, se seleccionó un ejemplar de cada una de las concentraciones para luego observarlos con un microscopio de fluorescencia bajo el filtro de luz azul (Zeiss AxioPlan2), donde solo las botellas PET y bombillas eran autofluorescentes. Para esto los ejemplares se fijaron en bouin hasta el momento de los cortes transversales con micrótopo. Una vez cortados se separaron en los segmentos antes mencionados se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina y se montaron en portaobjetos con permount para su posterior observación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Parámetros físico-químicos de las muestras de suelos.

La caracterización físico-química de la muestra de suelo obtenido del sitio de agricultura orgánica de la ciudad de Chillán. En la tabla 2, se presentan los resultados de los análisis físico-químicos.

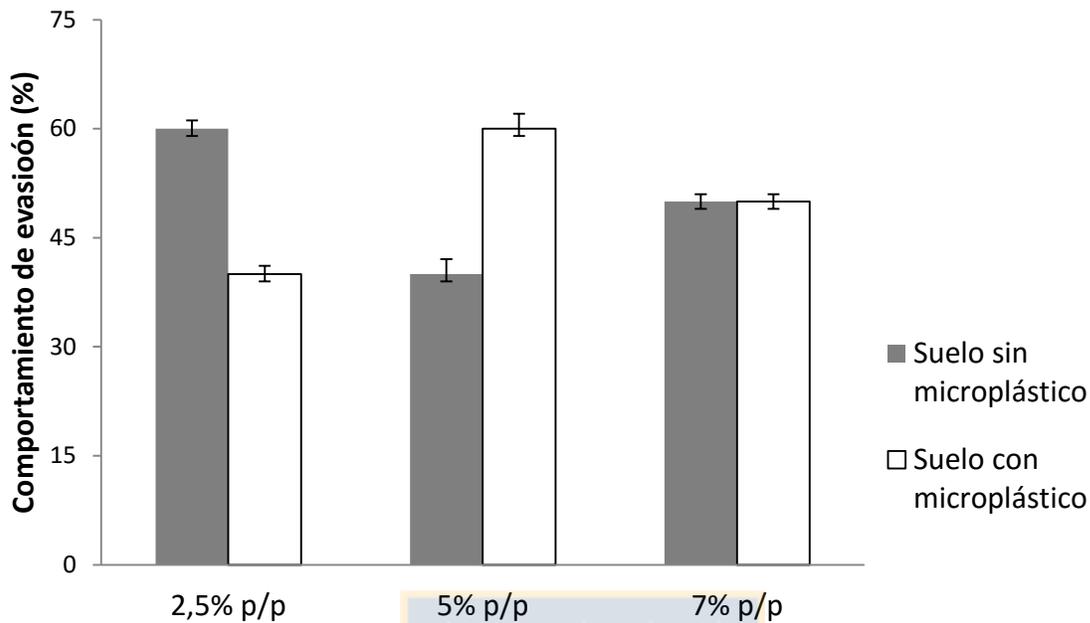
**Tabla 2.** Características de la muestra obtenida del predio agrícola de cultivos orgánicos.

Parámetro	
Granulometría	Limo, con una media de 15,60 $\mu$ m
Porcentaje de humedad	32,98%
Materia orgánica	25,29%

### 6.2. Bioensayos.

#### 6.2.1. Bioensayo de comportamiento.

En la figura 6 se entregan los porcentajes y desviación estándar, del ensayo de comportamiento realizado con *Lumbricus terrestris*. La mezcla del suelo con 2,5% de microplástico consistía de 487,5 gr de suelo y 12,5gr de microplástico, lugar en cual se encontró un 40% de los organismos; en 5% la mezcla estaba compuesta por en 475gr de suelo y 25 gr de microplástico, en el que se obtuvo un 60%; en 7% la mezcla fue de 465 gr de suelo y 35 gr de microplástico, en este caso los organismos no demostraron una preferencia por alguno de los suelos ya que se obtuvo un 50% de los organismos en cada sección.

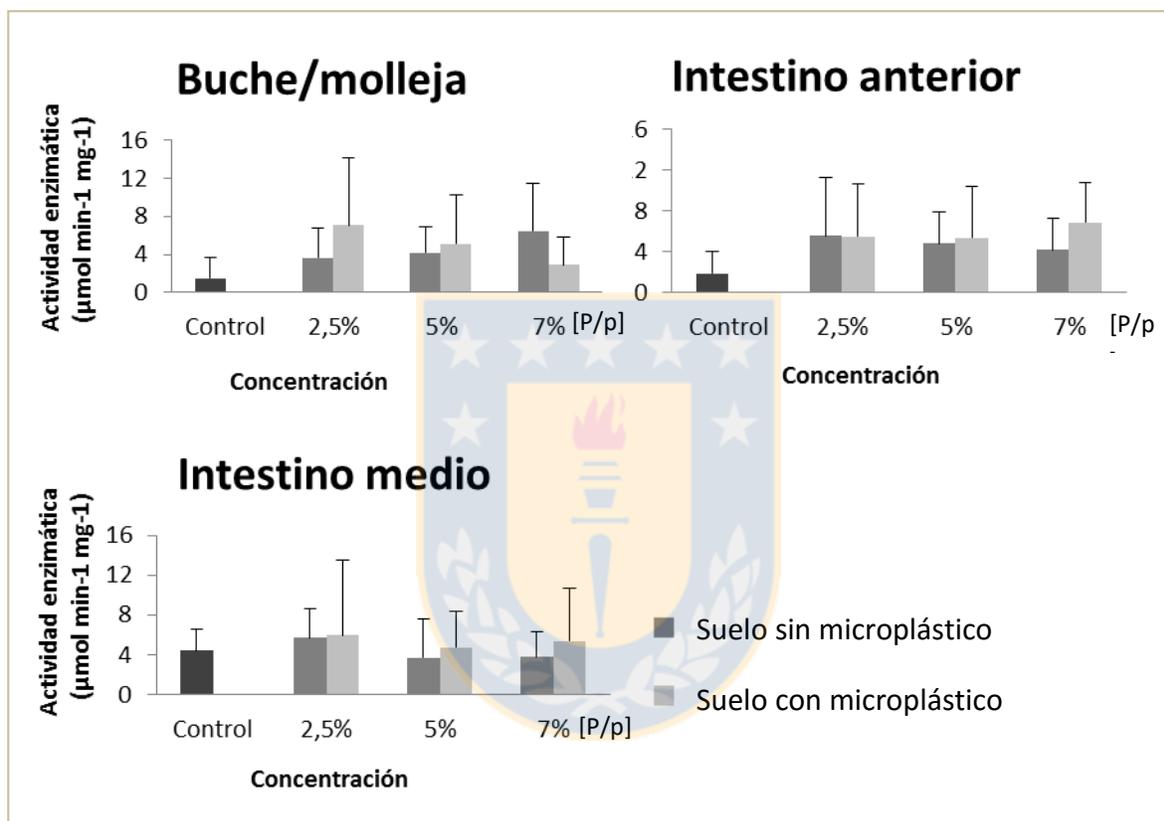


**Gráfico 1.** Comportamiento de evasión y desviación estándar.

Para que estos resultados sean válidos el número de lombrices muertas o perdidas debe ser menor del 10% por cada bioensayo (Cuevas D. M. C., C. Ferrera, L. E. Ríos y V. R. Rodríguez, 2006). Aunque si existió la muerte de uno de los organismos, esta fue producto de las lesiones provocadas por el desplazamiento ya que el microplástico se adhirió a su cuerpo. Por otra parte, de acuerdo a los criterios mencionados anteriormente, en la concentración con un 7% de microplástico como se obtuvo un 50% de evasión, se considera que no muestran preferencia por ningún tipo de suelo y que dicho suelo es un hábitat adecuado. En las concentraciones de 2,5% y 5% p/p no presentaron esta condición o no tenían el 20% para considerar que el suelo tiene un efecto sobre los organismos, sin embargo, las lombrices en los tres casos de estudio presentaron gran cantidad de quemaduras o lesiones por el microplástico que se adhería a su piel. Otros cambios morfológicos que se observaron fue el enrollamiento y adelgazamiento, donde el porcentaje de pérdida de peso en promedio de cada concentración (2,5%; 5% y 7%) fue de: 26%,31% y 20%, respectivamente. De acuerdo a esto último, no existe una relación dosis respuesta.

### 6.2.2. Análisis enzimático.

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis enzimático del biomarcador, acetilcolinesterasa (AChE), que se realizó a los organismos utilizados en el ensayo de comportamiento de evasión, se muestran en las gráfico 2.



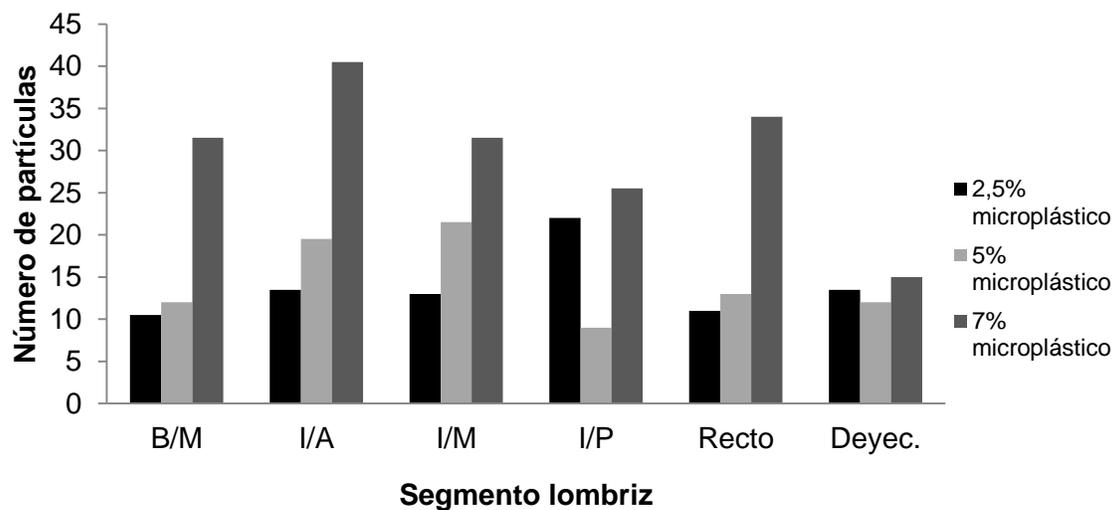
**Gráfico 2.** Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en los tejidos de buche/molleja, intestino anterior y medio de *Lumbricus terrestris*.

Tal como se observa en la figura 7 la actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) tanto en buche/molleja, intestina anterior y medio fue mayor a la del control, situación muy diferente a lo esperado si se compara con estudios realizados con metales pesados y pesticidas realizados por diversos autores como Calisi, A. et al. (2011), Rault, M. et al. (2007), Velkl, M. et al. (2010), etc. donde la actividad es menor o igual al control. Por otra parte al comparar ambos tipos de suelos a los que fueron expuestos se obtuvo que en el suelo sin microplástico, de buche/molleja, la actividad enzimática es directamente proporcional a la concentración expuesta, caso contrario ocurre en los organismos del suelo con microplástico donde disminuye. En el intestino anterior y medio al comparar ambos tipos de suelos, se observa una disminución de la actividad al aumentar la concentración el suelo sin microplástico, para el suelo con microplástico no existe una tendencia clara como se mencionó anteriormente.

Una posible respuesta al aumento de la actividad de AChE que se obtuvo, tiene relación con el estado físico en el cual se encontraron las lombrices con la que se midió la actividad enzimática, ya que como se mencionó anteriormente, estas presentaban diversos daños que fueron producto del microplástico adherido a su cuerpo y que al momento de avanzar provocaba las lesiones, es por esto que la lombriz quedaba en estado de letargo o reposo, para aminorar el daño, momento en el cual actúa el sistema nervioso parasimpático y pudiendo existir una mayor cantidad de acetilcolina.

### **6.2.3. Distribución de microplástico por segmento en *Lumbricus terrestris*.**

En el gráfico 3 se detalla el número de partículas de microplástico que se observaron, con la lupa estereoscópica, en los segmentos que se dividió la lombriz de tierra *Lumbricus terrestris* (buche/molleja (B/M), intestino anterior (I/A), intestino medio (I/M), intestino posterior (I/P), recto y deyecciones).



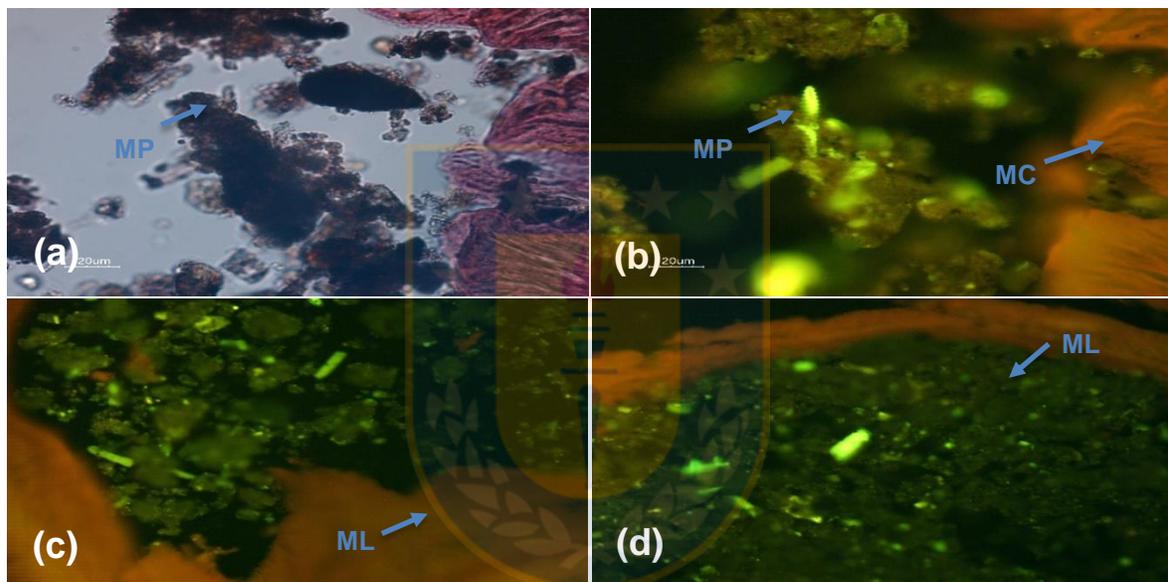
**Gráfico 3.** Número de partículas de microplástico promedio, por segmento de *Lumbricus terrestris*.

Se observó que el número de partículas de microplástico es directamente proporcional a la concentración de exposición. El segmento que contenía el mayor número de partículas de microplástico es diferente entre las tres concentraciones estudiadas siendo intestino posterior en la concentración de 2,5% p/p, intestino medio en la concentración de 5% p/p e intestino anterior para concentración de 7% p/p. Por el contrario el menor número de partículas, en los tres casos, se dio en las deyecciones. Por otra parte las lombrices perdieron peso en los tres escenarios, sin embargo, no se observó una relación entre la dosis de microplástico a las que fueron expuesta y la pérdida de peso, mismo caso se obtuvo en el experimento realizado por Lwanga E.H et al, (2016), ya que el porcentaje de pérdida de peso en promedio en los tres escenarios fue de un 30%.

Sin embargo, se cree que el número de partículas de microplástico es mucho mayor que en lo descrito anteriormente, ya que no es posible observar de manera clara con una lupa estereoscópica las partículas más pequeñas (<20 micras), tal como se observó en los cortes transversales realizados con micrótopo y observados con un microscopio con filtro de luz azul (Figuras 6, 7 y 8). El microplástico se observó

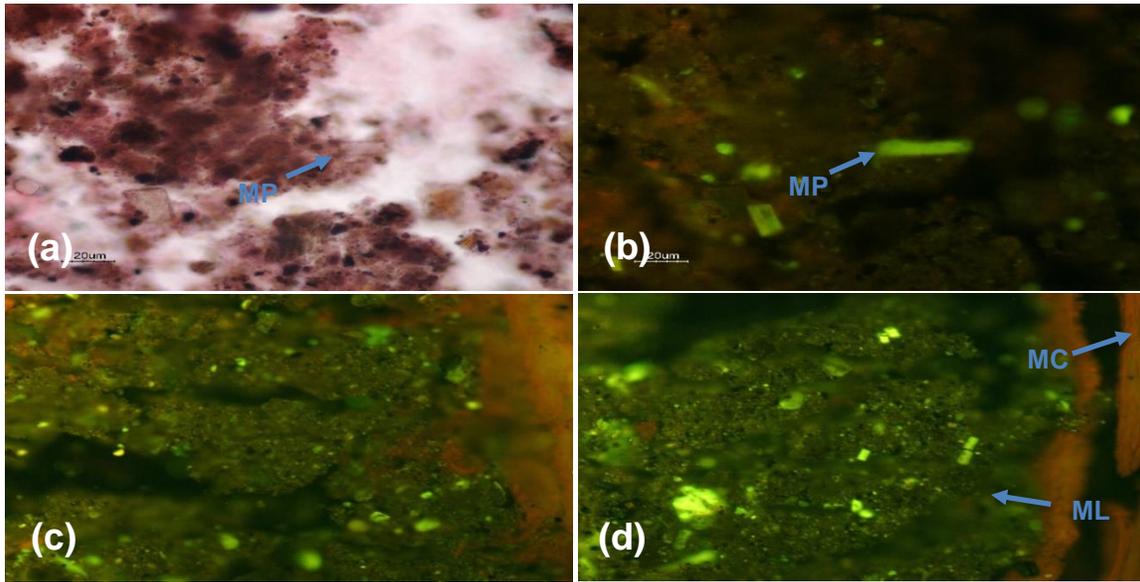
gracias a que dos de los cuatro plásticos utilizados en este estudio tenían agentes blanqueadores fluorescentes, los cuales son ampliamente utilizados en este tipo de productos (Qiong X uan Qiu et al., 2015).

En las figuras 6, 7 y 8 se muestran imágenes de los segmentos donde se observan partículas de microplástico (de color verde). En estas se logró identificar que el segmento que presenta un mayor número de partículas de microplástico es, para las tres concentraciones estudiadas, el intestino posterior.

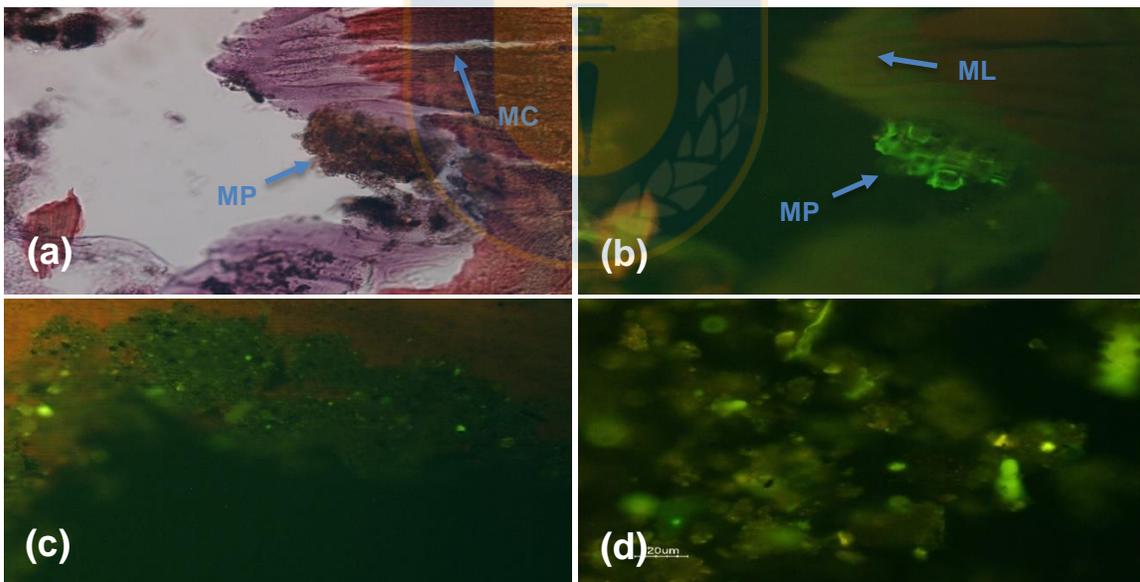


**Figura 6.** Imágenes de microplástico en *Lumbricus terrestris* expuesta a 2,5% p/p, molleja sin filtro de luz azul (a) y con filtro de luz azul (b), intestino medio (c) Intestino posterior (d).

En este método, al igual que en lo realizado con la lupa estereoscópica, existiría un error asociado ya que no es posible observar todas las partículas de los microplásticos utilizados en el bioensayo, esto debido a que éstas estaban aglomeradas (figura 8b), o bien, no todos los plásticos tenían agentes blanqueadores fluorescentes, solo 2 de ellos siendo estos las bombillas y botellas PET. Esto de acuerdo a pruebas realizadas previamente con el filtro de luz verde.



**Figura 7.** Imágenes de microplástico en *Lumbricus terrestris* expuesta a 5% p/p, intestino anterior sin filtro de luz azul (a) y con filtro de luz azul (b), intestino medio (c) e intestino posterior (d).



**Figura 8.** Imágenes de microplástico en *Lumbricus terrestris* expuesta a 7% p/p, molleja sin filtro de luz azul (a) y con filtro de luz azul (b), intestino medio (c) e intestino posterior (d).

En las imágenes 6, 7 y 8 de los segmentos se puede distinguir: MP=microplástico; ML=músculos longitudinales; MC= músculos circulares.

## 7. CONCLUSIONES

Para el desarrollo de la tesis se utilizó como bioindicador una especie de lombriz con una importancia ecológica y agronómica, con el objetivo de evaluar un diseño experimental para determinar el efecto del microplástico los efectos del microplástico en organismos terrestres, ya que en la mayoría de los estudios realizados para saber los efectos de este contaminante han sido en organismos acuáticos, con una gran variedad de especies. Sin embargo, dado que el microplástico no solo es posible encontrarlo en sistemas acuáticos, siendo este el destino final o último receptor, sino que también en ambientes terrestres, ya que este es el primer compartimento o receptor, es importante considerarlo en los estudios.

El ensayo de comportamiento de evasión que se utilizó, es como una herramienta de evaluación para la detección temprana de los posibles efectos de la exposición frente a ciertos contaminantes. En cuanto al resultado obtenido del bioensayo de evasión, realizado en tres concentraciones diferentes de microplástico (2,5%, 5% y 7% p/p), no se observó preferencia por ningún tipo de suelo, ya que la preferencia fue similar en los tres casos. En las tres concentraciones de estudio, la mayoría de los organismos al final del bioensayo presentaron quemaduras y lesiones graves, esto debido a que al desplazarse perdieron la mucosidad superficial.

Estas quemaduras y lesiones se asociaron a los resultados obtenidos del estudio de la actividad enzimática en el tracto gastrointestinal de la lombriz, ya que la actividad de AChE fue mucho mayor a la respuesta esperada en este tipo de bioensayos, donde por lo general la actividad es igual o inferior a la del control, inhibiéndose AChE, tal como lo descrito por autores como Calisi, A. et al., (2011), Rault, M. et al., (2007), Velkl, M. et al., (2010), entre otros, por lo que el microplástico no tiene efectos neurotóxicos en *Lumbricus terrestris*.

Esto podría deberse a que la lombriz, de cierta manera, estaba en un estado de letargo sin poder desplazarse, generándose una mayor cantidad de AChE, por lo que no estaría relacionado directamente por la ingesta de microplástico, si no, que éste actuaría como agente estresor externo, no afectando la inhibición de esta enzima.

Con respecto a los resultados obtenidos del bioensayo de ingesta para determinar la distribución de microplástico en la especie *Lumbricus terrestris*, permitió observar que no existe una relación entre las concentraciones de microplástico a las que fueron expuestas (2,5%; 5% y 7% p/p) y la pérdida de peso ya que el porcentaje de pérdida de peso en promedio, en los tres escenarios, fue de un 30%. Misma situación ocurrió en lo realizado por Lwanga E.H et al., (2016), donde las lombrices fueron expuestas a diferentes concentraciones de microplásticos, solo que la relación de microplástico fue con respecto al alimento de la lombriz, no a una cantidad de suelo como en este estudio. En cuanto a las partículas de microplástico, en cada segmento, es directamente proporcional a la concentración de exposición (2,5%; 5% y 7% p/p).

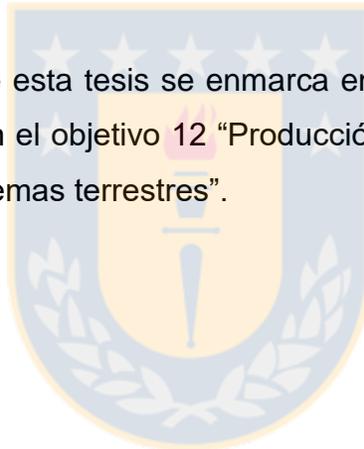
Al observar los segmentos utilizando la lupa estereoscópica se pudo identificar que el segmento que contenía el mayor número de partículas de microplástico es diferente entre las tres concentraciones estudiadas (2,5%; 5% y 7% p/p), siendo estos el intestino posterior, intestino medio e intestino anterior, respectivamente. Por el contrario el menor número de partículas, en los tres casos, se dio en las deyecciones. Sin embargo, de acuerdo a lo observado en el microscopio de fluorescencia el segmento que presenta un mayor número de partículas de microplástico, para las tres concentraciones estudiadas, es el intestino posterior.

En ambos métodos podría existir un error asociado ya que no fue posible observar la totalidad de las partículas de microplástico, ya que en el primer método el tamaño de la partícula presenta un problema al observarla por medio de este equipo. Por el contrario en el segundo método, se debe a que las partículas de microplástico estaban aglomeradas y no todos los plásticos tenían agentes blanqueadores

fluorescentes, presente en dos de ellos bombillas y botellas PET. Esto de acuerdo a pruebas realizadas previamente con el filtro de luz verde. Por lo que sería de gran ayuda utilizar métodos de tinción y/o otros equipos que permitan disminuir el error asociado para su detección y posterior conteo de partículas de microplástico para así obtener mejores resultados de su distribución.

Finalmente en base a los resultados obtenidos, se sugiere utilizar otro equipo para conteo relativo como FTIR que, además, permite realizarlo por tipología de plástico y el uso de concentraciones de microplástico menores a las utilizadas en el desarrollo de los bioensayos de este estudio, para el desarrollo de futuras investigaciones en organismos edáficos.

Además, quisiera indicar que esta tesis se enmarca en los Objetivos de Desarrollo Sostenible contribuyendo con el objetivo 12 “Producción y consumo responsable” y el objetivo 15 “Vida y ecosistemas terrestres”.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 8, p. 1596-1605, Aug 2011. ISSN 0025-326X.
- ARTHUR, C., Baker, J., 2009. Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris.
- BESSELING, E. et al. Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. magna*. *Environmental Science & Technology*, v. 48, n. 20, p. 12336-12343, Oct 21 2014. ISSN 0013-936X
- BRENNECKE, D. et al. Ingested microplastics (> 100  $\mu$  m) are translocated to organs of the tropical fiddler crab *Ucarapax*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 96, n. 1-2, p. 491-495, Jul 15 2015. ISSN 0025-326X.
- BROWNE, M.A., Galloway, T., Thompson, R., 2007. Microplastic—an emerging contaminant of potential concern? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 559–561.
- CARPENTER, E. J., Anderson, S. J., Harvey, G. R., Miklas, H. P., & Peck, B. B. (1972). Polystyrenespherules in coastalwaters. *Science*, 178, 749–750.
- CARPENTER, E., & Smith, K. (1972). Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science*, 175, 1240–1241.
- CLAESSENS, M. et al. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, v. 70, n. 1-2, p. 227-233, May 15 2013. ISSN 0025-326X.

- COLE, M. et al. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 12, p. 2588-2597, Dec 2011. ISSN 0025-326X.
- COLTON, J. B, Jr, Knapp, F. D., & Burns, B. R. (1974). Plastic particles in surface waters of the northwestern Atlantic. *Science*, 185, 491–497.
- DESFORGES, J.-P. W. et al. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, v. 79, n. 1-2, p. 94-99, Feb 15 2014. ISSN 0025-326X.
- ENDO, S. et al. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: Variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin*, v. 50, n. 10, p. 1103-1114, Oct 2005. ISSN 0025-326X.
- EUCommision, 2011. In: Commision, E. (Ed.), *PlasticWaste: Ecological and Human Health Impacts*. ScienceforEnvironmentPolicy, Europe.
- FAUZIAH, S. H.; LIYANA, I. A.; AGAMUTHU, P. Plastic debris in the coastal environment: The invincible threat? Abundance of buried plastic debris on Malaysian beaches. *Waste Management & Research*, v. 33, n. 9, p. 812-821, Sep 2015. ISSN 0734-242X.
- FENDALL, L. S.; SEWELL, M. A. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, n. 8, p. 1225-1228, Aug 2009. ISSN 0025-326X.
- FOWLER, C. W. (1987). Marine debris and northern fur seals: A case study. *Marine Pollution Bulletin*, 18, 326–335.

- GALLOWAY, T. S. (2015). Micro- and nano-plastics and human health. In M. Bergmann, L. Gutow & M. Klages (Eds.), *Marine anthropogenic litter* (pp. 347–370). Berlin: Springer.
- GREGORY, M. R. Environmental implications of plastic debris in marine settings-entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 364, n. 1526, p. 2013-2025, Jul 27 2009. ISSN 0962-8436.
- GUTOW, L. et al. Experimental Evaluation of Seaweeds as a Vector for Microplastics into Marine Food Webs. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 2, p. 915-923, Jan 19 2016. ISSN 0013-936X.
- HARTMANN, N., Nolte, T., Sørensen, M., Jensen, P., Baun, A., 2015. Aquatic ecotoxicity testing of nanoplastics. *Lessons Learned From Nanoecotoxicology*. DTU Environment.
- HIDALGO-RUZ, V. et al. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, v. 46, n. 6, p. 3060-3075, Mar 2012. ISSN 0013-936X.
- HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment*, v. 586, p. 127-141, May 15 2017. ISSN 0048-9697. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000398758800013 >.
- IMHOF, H. K. et al. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnology and Oceanography-Methods*, v. 10, p. 524-537, Jul 2012. ISSN 1541-5856.

- IVAR DO SUL, J. A.; COSTA, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*, v. 185, p. 352-364, Feb 2014. ISSN 0269-7491.
- JAMBECK, J. R. et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, v. 347, n. 6223, p. 768-771, Feb 13 2015. ISSN 0036-8075.
- KEIN, S.; WORCH, E.; KNEPPER, T. P. Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in River Shore Sediments of the Rhine-Main Area in Germany. *Environmental Science & Technology*, v. 49, n. 10, p. 6070-6076, May 2015. ISSN 0013-936X.
- KOELMANS, A. A. (2015). Modeling the role of microplastics in bioaccumulation of organic Chemicals to marine aquatic organisms. *Critical review*. In M. Bergmann, L.
- LAMBERT, S., Sinclair, C., Boxall, A., 2014. Occurrence, degradation, and effect of polymerbased materials in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 227, 1–53. *Microplastic Marine Debris*.
- LEE, J. et al. Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 77, n. 1-2, p. 349-354, Dec 2013. ISSN 0025-326X.
- LWANGA, E. H. et al. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 5, p. 2685-2691, Mar 2016. ISSN 0013-936X.

- MAJEWSKY, M. et al. Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC). *Science of the Total Environment*, v. 568, p. 507-511, Oct 15 2016. ISSN 0048-9697.
- Nch 2083. 1999. Aguas – Bioensayos de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphniapulex* (Crustacea, Cladocera). Instituto Nacional de Estadística, INN – Chile.
- NUELLE, M. T. et al. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution*, v. 184, p. 161-169, Jan 2014. ISSN 0269-7491.
- REHSE, S.; KLOAS, W.; ZARFL, C. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 153, p. 91-99, Jun 2016. ISSN 0045-6535.
- ROCHA-SANTOS, T., Duarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrACTrends Anal. Chem.* 65, 47–53.
- RYAN, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 1999–2012.
- SETALA, O.; NORKKO, J.; LEHTINIEMI, M. Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community. *Marine Pollution Bulletin*, v. 102, n. 1, p. 95-101, Jan 15 2016. ISSN 0025-326X.

- SJOLLEMA, S. B. et al. Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 259-261, Jan 2016. ISSN 0166-445X.
- TEUTEN, E. L. et al. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 22, p. 7759-7764, Nov 15 2007. ISSN 0013-936X.
- TEUTEN, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., et al., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 2027–2045.
- THOMPSON, R. C., Moore, C., Andrady, A., Gregory, M., Takada, H., & Weisberg, S. (2005). New directions in plastic debris. *Science*, 310, 1117.
- \_\_\_\_\_. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 364, n. 1526, p. 2027-2045, Jul 27 2009. ISSN 0962-8436.
- VAN CAUWENBERGHE, L. et al. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution*, v. 199, p. 10-17, Apr 2015. ISSN 0269-7491.
- WARDROP, P. et al. Chemical Pollutants Sorbed to Ingested Microbeads from Personal Care Products Accumulate in Fish. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 7, p. 4037-4044, Apr 2016. ISSN 0013-936X.
- WRIGHT, S. L.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, v. 178, p. 483-492, Jul 2013. ISSN 0269-7491.

- WURL, O.; OBBARD, J. P. A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat for marine organisms. *Marine Pollution Bulletin*, v. 48, n. 11-12, p. 1016-1030, Jun 2004. ISSN 0025-326X.



## 9. ANEXOS

Anexo 1. Tabla con valores obtenidos en los bioensayos de evasión realizados en tres concentraciones diferentes de exposición a microplástico.

**Tabla 1.** Porcentajes de evasión y su desviación estándar de las tres concentraciones en estudio.

Suelo sin microplástico	Suelo con 2,5% de microplástico	Suelo sin microplástico	Suelo con 5% de microplástico	Suelo sin microplástico	Suelo con 7% de microplástico
60%±1,15*	40%±1,15*	40%±2,08*	60%±2,08*	50%±1,00*	50%±1,00*

\*Considerando 18 ejemplares

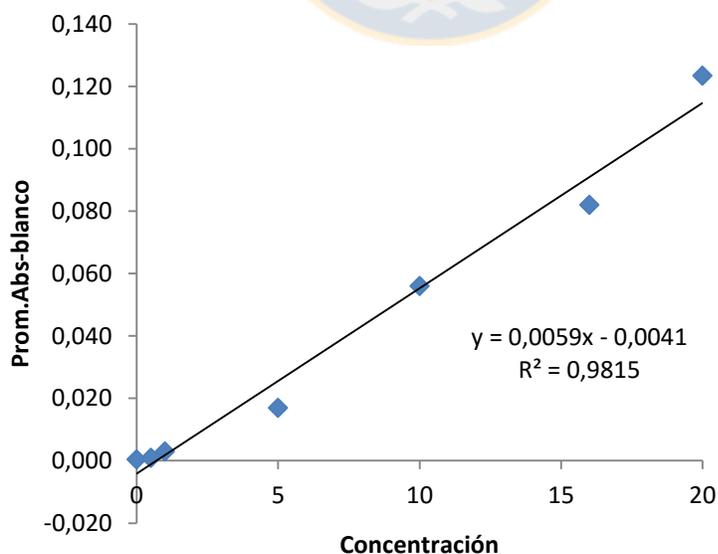


**Anexo 2. Tablas de datos de absorbancias, curvas de calibración y cálculo de actividad enzimática de los segmentos seleccionados de *Lumbricus terrestris*, expuestas a una concentración de 2,5% p/p de microplástico.**

**Tabla 2.** Datos de absorbancia del segmento buche/molleja.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Prom.Abs-blanco
0	0,125	0,127	0,126	0,001
0,5	0,127	0,126	0,127	0,001
1	0,128	0,129	0,129	0,003
5	0,146	0,139	0,143	0,017
10	0,181	0,182	0,182	0,056
16	0,207	0,208	0,208	0,082
20	0,268	0,23	0,249	0,124
BLANCO	0,126	0,125	0,126	

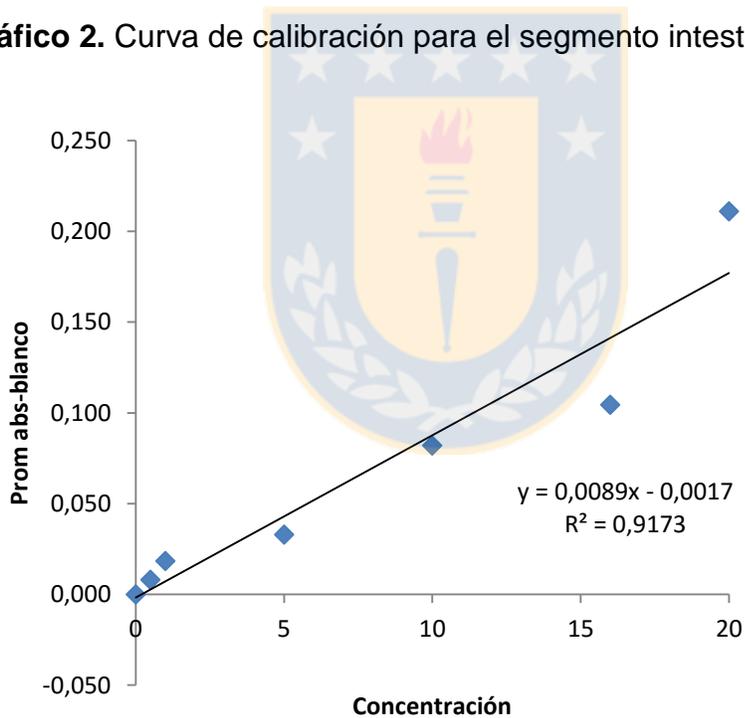
**Gráfico1.** Curva de calibración para el segmento buche/molleja.



**Tabla 3.** Datos de absorbancia del segmento intestino anterior.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Prom.Abs-blanco
0	0,121	0,13	0,126	0,000
0,5	0,124	0,143	0,134	0,008
1	0,159	0,129	0,144	0,019
5	0,172	0,145	0,159	0,033
10	0,229	0,186	0,208	0,082
16	0,251	0,209	0,230	0,105
20	0,402	0,271	0,337	0,211
BLANCO	0,13	0,121	0,126	

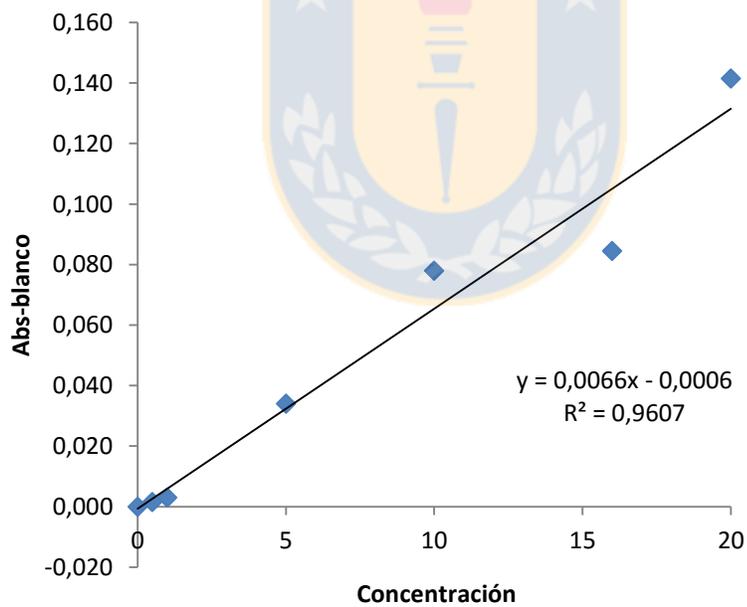
**Gráfico 2.** Curva de calibración para el segmento intestino anterior.



**Tabla 4.** Datos de absorbancia del segmento intestino medio.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Prom.Abs-blanco
0	0,127	0,126	0,127	0,000
0,5	0,129	0,127	0,128	0,002
1	0,131	0,128	0,130	0,003
5	0,165	0,156	0,161	0,034
10	0,211	0,198	0,205	0,078
16	0,223	0,199	0,211	0,085
20	0,271	0,265	0,268	0,142
BLANCO	0,127	0,126	0,127	

**Gráfico 3.** Curva de calibración para el segmento intestino medio.



**Tabla 5. Datos de lecturas de absorbancia y AChE, ejemplares correspondientes al lado con microplástico.**

Segmento	Proteínas						AChE						
	Abs/min (1)	Abs/min (2)	Abs/min (mean)	mg/ml	mean	sd	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Abs (mean)	nmol/min x mg protein	Mean	SD
Buche/ molleja	0,111	0,123	0,117	0,020	<b>0,069</b>	<b>0,043</b>	0,443		0,661	0,552	0,0082	<b>0,0036</b>	<b>0,003</b>
	0,681	0,123	0,402	0,068			0,333	0,524		0,429	0,0018		
	1,054	0,775	0,915	0,155			0,392	0,348		0,370	0,0007		
	0,618	0,128	0,373	0,063			0,761	0,778		0,770	0,0036		
	0,13	0,123	0,127	0,021			0,844	0,404		0,624	0,0086		
	0,971	0,125	0,548	0,093			0,319	0,301	0,277	0,299	0,0009		
	0,332	0,314	0,323	0,055			0,521	0,546		0,534	0,0029		
	0,824	0,124	0,474	0,080			0,675	0,614		0,645	0,0024		
Intestino anterior	0,122	0,118	0,120	0,013	<b>0,049</b>	<b>0,037</b>		0,885	0,976	0,931	0,0203	<b>0,0096</b>	<b>0,010</b>
	0,204	0,123	0,164	0,018			1,003		1,095	1,049	0,0168		
	0,214	1,184	0,699	0,079			0,267	0,751		0,509	0,0019		
	0,632	0,665	0,649	0,073			1,618		1,222	1,420	0,0057		
	0,534	0,149	0,342	0,038			0,188	0,178	0,179	0,182	0,0014		
	1,351	0,702	1,027	0,115				0,512	0,405	0,459	0,0012		
	0,522	0,152	0,337	0,038				0,472	0,438	0,455	0,0035		
	0,126	0,12	0,123	0,014			1,039		1,439	1,239	0,0264		
Intestino medio	0,242	0,134	0,188	0,028	<b>0,031</b>	<b>0,015</b>	0,412	0,426	0,429	0,422	0,0044	<b>0,0042</b>	<b>0,0022</b>
	0,153	0,668	0,411	0,062			0,295	0,254	0,233	0,261	0,0012		
	0,156	0,13	0,143	0,022			0,295		0,288	0,292	0,0040		
	0,149	0,138	0,144	0,022			0,341		0,475	0,408	0,0055		
	0,124	0,121	0,123	0,019			0,225	0,776		0,501	0,0079		
	0,294	0,132	0,213	0,032			0,203	0,242		0,223	0,0020		
	0,27	0,153	0,212	0,032				0,483	0,48	0,482	0,0044		

**Tabla 6.** Datos de lecturas de absorbancia y AChE, ejemplares correspondientes al lado sin microplástico.

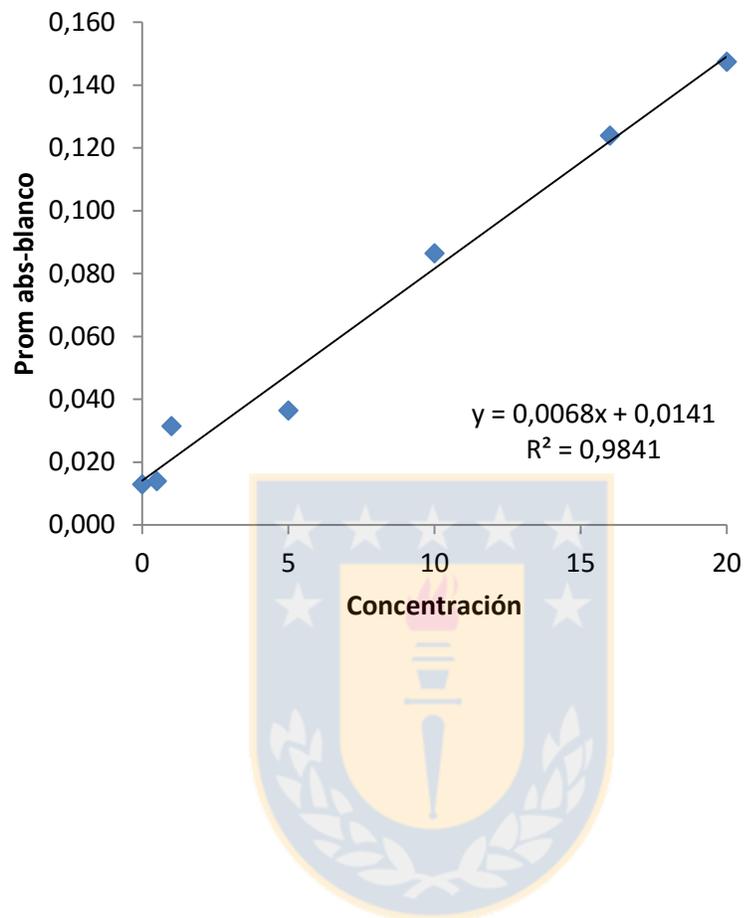
Segmento	Proteínas						AChE						
	Abs/min (1)	Abs/min (2)	Abs/min (mean)	mg/ml	mean	sd	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Abs (mean)	nmol/min x mg protein	Mean	SD
Buche/ molleja	0,806	0,124	0,465	0,079	<b>0,053</b>	<b>0,035</b>		0,683	0,565	0,624	0,0023	<b>0,0047</b>	<b>0,0047</b>
	0,124	0,153	0,139	0,023			0,369	0,312	0,341	0,0043			
	0,116	0,122	0,119	0,020			1,156	1,038	1,097	0,0160			
	0,245	0,124	0,185	0,031				0,522	0,584	0,553	0,0052		
	0,419	0,167	0,293	0,050			0,466	0,446		0,456	0,0027		
	0,989	0,133	0,561	0,095			0,278	0,307		0,293	0,0009		
	1,228	0,145	0,687	0,116			0,397		0,412	0,405	0,0010		
	0,231	0,126	0,179	0,030			0,251	0,676		0,464	0,0045		
	0,201	0,125	0,163	0,028			0,317	0,657		0,487	0,0052		
Intestino anterior	0,182	0,14	0,161	0,018	<b>0,038</b>	<b>0,028</b>		0,273	0,209	0,241	0,0039	<b>0,0055</b>	<b>0,0051</b>
	0,15	0,148	0,149	0,017			0,63	0,795	0,741	0,722	0,0127		
	0,134	0,126	0,130	0,015				0,719	0,752	0,736	0,0148		
	0,152	0,633	0,393	0,044			0,252	0,315	0,281	0,283	0,0019		
	0,403	1,047	0,725	0,081				0,389	0,513	0,451	0,0016		
	0,149	0,125	0,137	0,015			0,268	0,288	0,281	0,279	0,0053		
	1,154	0,101	0,628	0,071			0,274	0,265	0,416	0,318	0,0013		
	0,138	0,129	0,134	0,015			0,339	0,337	0,352	0,343	0,0067		
	1,117	0,128	0,623	0,070			0,32	0,284		0,302	0,0013		
Intestino medio	0,129	0,151	0,140	0,021	<b>0,054</b>	<b>0,043</b>	0,252	0,234	0,237	0,241	0,0033	<b>0,0044</b>	<b>0,0056</b>
	0,59	0,129	0,360	0,054			0,258	0,23	0,248	0,245	0,0013		
	0,132	0,131	0,132	0,020			0,199		0,198	0,199	0,0029		
	0,135	0,116	0,126	0,019			0,206	0,411	0,277	0,298	0,0046		
	0,125	0,129	0,127	0,019				1,081	1,264	1,173	0,0179		
	0,143	0,844	0,494	0,075			0,38	0,211		0,296	0,0012		
	0,667	1,123	0,895	0,136			0,76	0,774		0,767	0,0017		
	0,171	1,033	0,602	0,091				0,703	0,805	0,754	0,0024		

**Anexo 3. Tablas de datos de absorbancias, curvas de calibración y cálculo de actividad enzimática de los 3 segmentos seleccionados de *Lumbricus terrestris*, expuestas a una concentración de 5% p/p de microplástico.**

**Tabla 7.** Datos de absorbancia del segmento buche/molleja.

<b>Concentración</b>	<b>Abs-1</b>	<b>Abs-2</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promabs-blanco</b>
0	0,116	0,122	0,119	0,013
0,5	0,122	0,118	0,120	0,014
1	0,147	0,128	0,138	0,032
5	0,147	0,138	0,143	0,037
10	0,204	0,181	0,193	0,087
16	0,235	0,225	0,230	0,124
20	0,252	0,255	0,254	0,148
BLANCO	0,109	0,103	0,106	

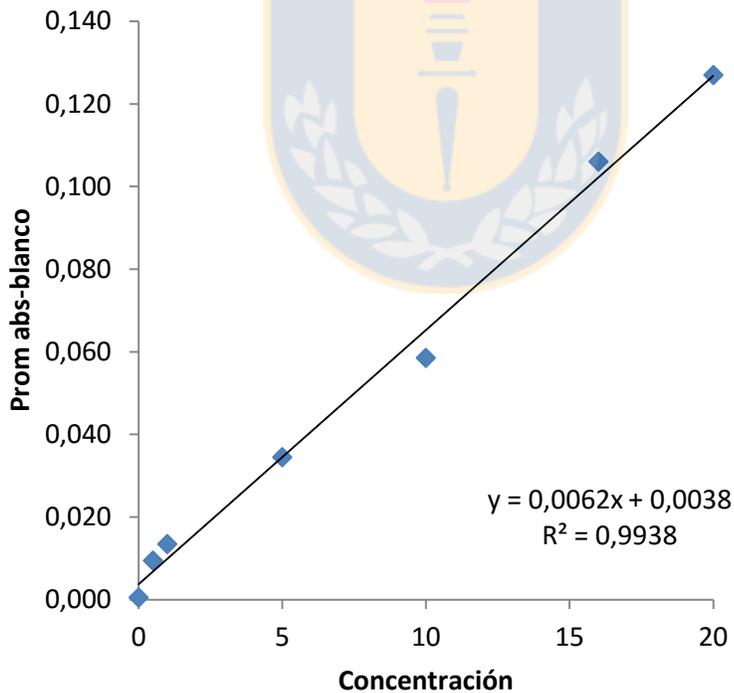
**Gráfico 4.** Curva de calibración para el segmento buche/molleja.



**Tabla 8.** Datos de absorbancia del segmento intestino anterior.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Promabs-blanco
0	0,123	0,125	0,124	0,001
0,5	0,137	0,129	0,133	0,010
1	0,135	0,139	0,137	0,014
5	0,163	0,153	0,158	0,035
10	0,188	0,176	0,182	0,059
16	0,232	0,227	0,230	0,106
20	0,272	0,229	0,251	0,127
BLANCO	0,123	0,124	0,124	

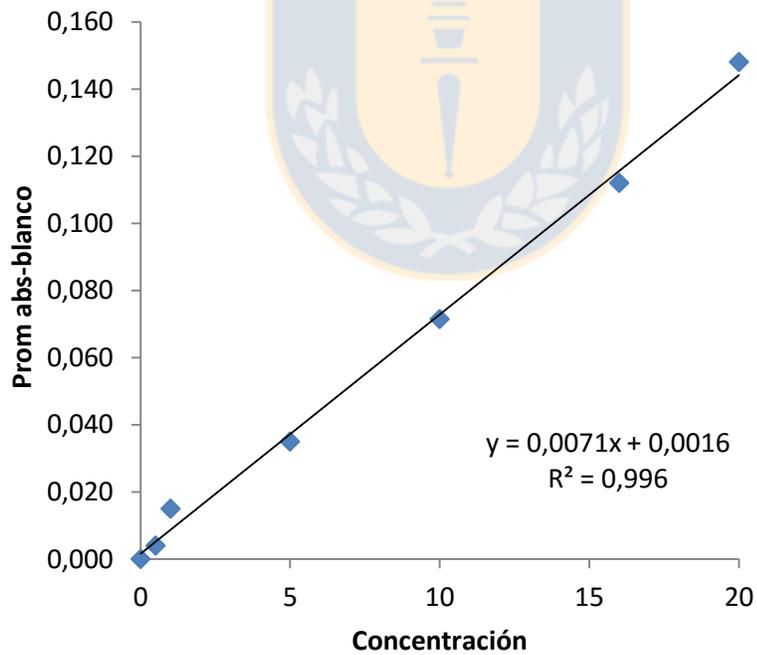
**Gráfico 5.** Curva de calibración para el segmento intestino anterior.



**Tabla 9.** Datos de absorbancia del segmento intestino medio.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Promabs-blanco
0	0,124	0,127	0,126	0,000
0,5	0,13	0,129	0,130	0,004
1	0,15	0,131	0,141	0,015
5	0,163	0,158	0,161	0,035
10	0,197	0,197	0,197	0,072
16	0,241	0,234	0,238	0,112
20	0,279	0,268	0,274	0,148
BLANCO	0,125	0,126	0,126	

**Gráfico 6.** Curva de calibración para el segmento intestino medio.



**Tabla 10.** Datos de lecturas de absorbancia y AChE, ejemplares correspondientes al lado con microplástico.

Segmento	Proteínas						AChE						
	Abs/min (1)	Abs/min (2)	Abs/min (mean)	mg/ml	mean	sd	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Abs (mean)	nmol/min x mg protein	Mean	SD
Buche/ molleja	0,9	0,682	0,791	0,116	<b>0,072</b>	<b>0,044</b>	0,412	0,446		0,429	0,0011	<b>0,0042</b>	<b>0,003</b>
	0,255	0,12	0,188	0,028			0,375	0,391		0,383	0,0041		
	0,247	0,124	0,186	0,027			0,402	0,775		0,589	0,0063		
	0,498	0,125	0,312	0,046			0,704	1,504	1,337	1,182	0,0076		
	0,781	0,123	0,452	0,066			1,189		1,869	1,529	0,0068		
	0,244	0,846	0,545	0,080			0,585	0,656		0,621	0,0023		
	0,675	1,241	0,958	0,141			0,509	0,583	0,825	0,639	0,0013		
Intestino anterior	0,813	0,453	0,633	0,102	<b>0,057</b>	<b>0,032</b>	0,586	0,405	0,395	0,462	0,0013	<b>0,0048</b>	<b>0,003</b>
	0,748	0,273	0,511	0,082			0,852	1,137	1,469	1,153	0,0041		
	0,591	0,486	0,539	0,087			0,749	0,435		0,592	0,0020		
	0,354	0,123	0,239	0,038			0,859	0,937		0,898	0,0069		
	0,321	0,124	0,223	0,036			0,344	0,309	0,377	0,343	0,0028		
	0,155	0,211	0,183	0,030			0,672		0,68	0,676	0,0067		
	0,159	0,126	0,143	0,023			0,995	0,589	0,7	0,761	0,0097		
Intestino medio	0,392	0,166	0,279	0,039	<b>0,047</b>	<b>0,020</b>	0,219		0,186	0,203	0,0015	<b>0,0037</b>	<b>0,0039</b>
	0,21	0,136	0,173	0,024			1,009	0,889		0,949	0,0115		
	0,453	0,381	0,417	0,059				0,622	0,699	0,661	0,0033		
	0,266	0,774	0,520	0,073			0,649		0,525	0,587	0,0024		
	0,736	0,12	0,428	0,060			0,355	0,168		0,262	0,0013		
	0,286	0,119	0,203	0,029				0,196	0,208	0,202	0,0021		

**Tabla 11. Datos de lecturas de absorbancia y AChE, ejemplares correspondientes al lado sin microplástico.**

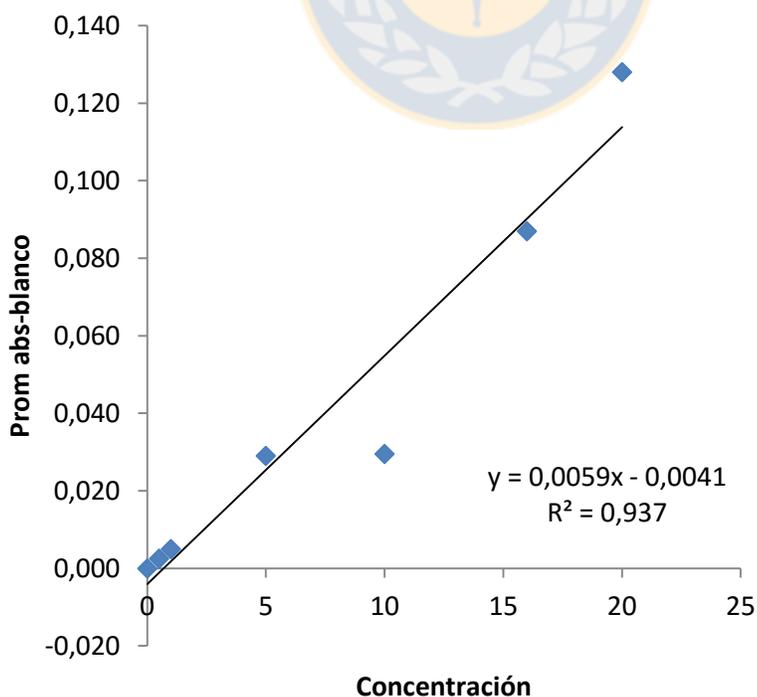
Segmento	Proteínas						AChE						
	Abs/min (1)	Abs/min (2)	Abs/min (mean)	mg/ml	mean	sd	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Abs (mean)	nmol/min x mg protein	Mean	SD
Buche/ molleja	0,306	0,97	0,638	0,094	<b>0,069</b>	<b>0,038</b>		0,341	0,499	0,420	0,0013	<b>0,0051</b>	<b>0,0051</b>
	0,169	0,123	0,146	0,021			0,444	0,43	0,405	0,426	0,0058		
	0,31	0,194	0,252	0,037			0,768	0,675	0,726	0,723	0,0057		
	0,869	0,835	0,852	0,125			0,656	0,729		0,693	0,0016		
	0,171	0,578	0,375	0,055			0,389	0,162		0,276	0,0015		
	0,313	0,124	0,219	0,032				1,57	1,628	1,599	0,0146		
	0,75	0,892	0,821	0,121			0,966		0,979	0,973	0,0024		
	0,165	0,121	0,143	0,021			1,196		0,908	1,052	0,0147		
	0,927	0,125	0,526	0,077			1,488	1,843		1,666	0,0063		
	1,132	0,142	0,637	0,094			0,289		0,276	0,283	0,0009		
0,716	0,456	0,586	0,086			0,387	0,402	0,413	0,401	0,0014			
Intestino anterior	0,703	1,196	0,950	0,153	<b>0,055</b>	<b>0,040</b>	0,654	0,587		0,621	0,0012	<b>0,0054</b>	<b>0,0050</b>
	0,254	0,122	0,188	0,030			0,386	0,321	0,412	0,373	0,0036		
	0,57	0,109	0,340	0,055			0,485	0,47	0,493	0,483	0,0026		
	0,766	0,124	0,445	0,072			0,976	1,165		1,071	0,0044		
	0,451	0,122	0,287	0,046			0,371	0,15		0,261	0,0017		
	0,147	0,117	0,132	0,021				1,336	1,28	1,308	0,0181		
	0,28	0,737	0,509	0,082			0,523	0,51		0,517	0,0019		
	0,185	0,122	0,154	0,025			0,244	0,404	0,268	0,305	0,0036		
	0,196	0,778	0,487	0,079			1,138	1,508		1,323	0,0050		
	0,169	0,128	0,149	0,024			0,592	0,527		0,560	0,0069		
0,141	0,121	0,131	0,021			0,593		0,887	0,740	0,0103			
Intestino medio	0,174	0,113	0,144	0,020	<b>0,053</b>	<b>0,031</b>	0,733	0,863		0,798	0,0116	<b>0,0047</b>	<b>0,0036</b>
	0,856	0,131	0,494	0,070			0,996		0,608	0,802	0,0034		
	0,41	0,547	0,479	0,067			0,538	0,218		0,378	0,0016		
	0,149	0,195	0,172	0,024			0,732	0,871		0,802	0,0097		
	0,16	0,165	0,163	0,023			0,316	0,472		0,394	0,0051		
	0,364	0,993	0,679	0,096			0,32		0,301	0,311	0,0010		
	0,295	0,578	0,437	0,061			0,296	0,458		0,377	0,0018		
	0,199	0,194	0,197	0,028			0,732	0,845		0,789	0,0084		
	0,233	0,697	0,465	0,065			0,629	0,801	0,913	0,781	0,0035		
	0,799	0,709	0,754	0,106			1,073		1	1,037	0,0029		

**Anexo 4. Tablas de datos de absorbancias, curvas de calibración y cálculo de actividad enzimática de los segmentosselleccionados de *Lumbricus terrestris*, expuestas a una concentración de 7% p/p de microplástico.**

**Tabla 12.** Datos de absorbancia del segmento buche/molleja.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Promabs-blanco
0	0,119	0,121	0,120	0,000
0,5	0,12	0,125	0,123	0,003
1	0,127	0,123	0,125	0,005
5	0,154	0,144	0,149	0,029
10	0,134	0,165	0,150	0,030
16	0,207	0,207	0,207	0,087
20	0,269	0,227	0,248	0,128
BLANCO	0,121	0,119	0,120	

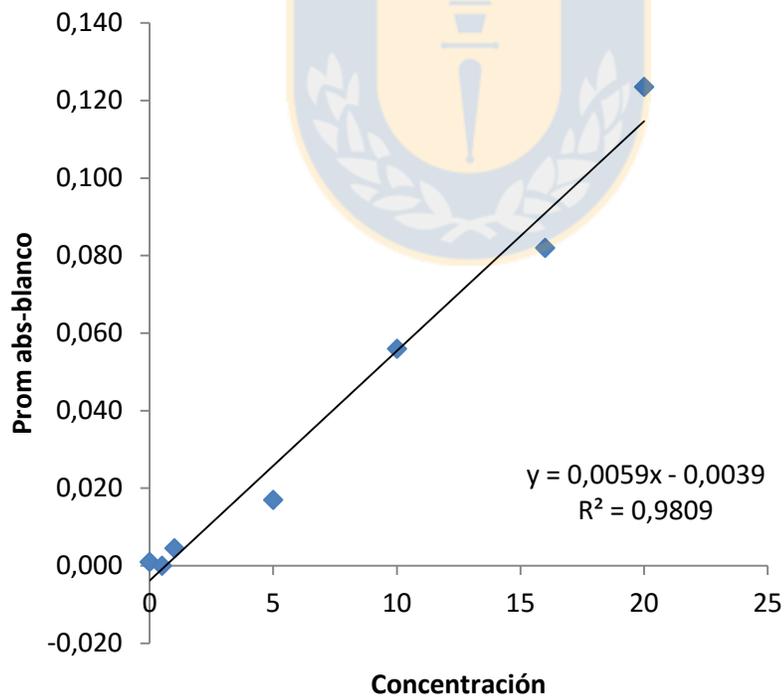
**Gráfico 7.** Curva de calibración para el segmento buche/molleja.



**Tabla 13.** Datos de absorbancia del segmento intestino anterior.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Promabs-blanco
0	0,127	0,126	0,127	0,001
0,5	0,133	0,128	0,131	0,005
1	0,156	0,13	0,143	0,017
5	0,166	0,157	0,162	0,036
10	0,198	0,185	0,192	0,066
16	0,24	0,229	0,235	0,109
20	0,272	0,244	0,258	0,132
BLANCO	0,128	0,124	0,126	

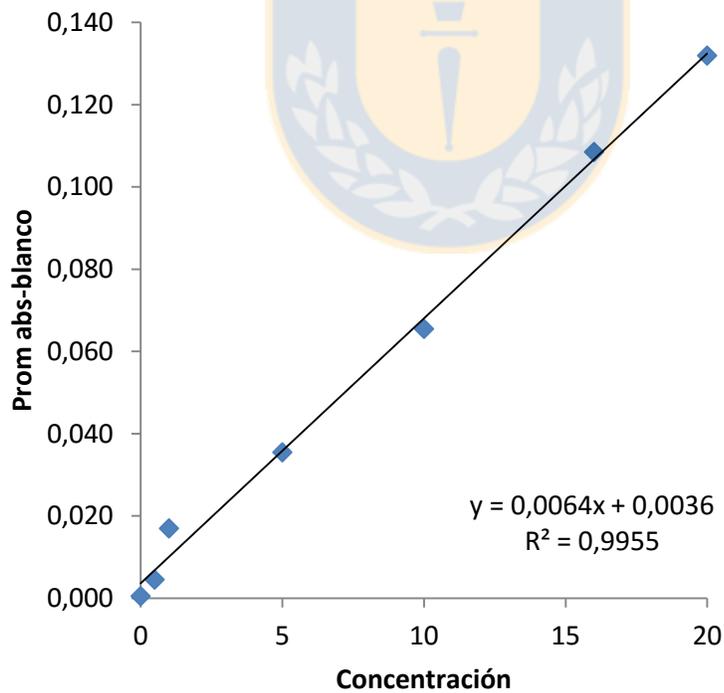
**Gráfico 8.** Curva de calibración para el segmento intestino anterior.



**Tabla 14.** Datos de absorbancia del segmento intestino medio.

Concentración	Abs-1	Abs-2	Promedio	Promabs-blanco
0	0,127	0,126	0,127	0,001
0,5	0,133	0,128	0,131	0,005
1	0,156	0,13	0,143	0,017
5	0,166	0,157	0,162	0,036
10	0,198	0,185	0,192	0,066
16	0,24	0,229	0,235	0,109
20	0,272	0,244	0,258	0,132
BLANCO	0,128	0,124	0,126	

**Gráfico 9.** Curva de calibración para el segmento intestino medio.



**Tabla 15.** Datos de lecturas de absorbancia y AChE, ejemplares correspondientes al lado con microplástico.

Segmento	Proteínas						AChE						
	Abs/min (1)	Abs/min (2)	Abs/min (mean)	mg/ml	mean	sd	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Abs (mean)	nmol/min x mg protein	Mean	SD
Buche/ molleja	0,678	1,014	0,846	0,143	<b>0,067</b>	<b>0,050</b>		0,993	0,907	0,950	0,0019	<b>0,0064</b>	<b>0,005</b>
	0,75	0,702	0,726	0,123			0,735	0,853	0,794	0,0019			
	0,737	0,628	0,683	0,116			0,292	0,182	0,292	0,255	0,0006		
	0,116	0,131	0,124	0,021			1,058		0,783	0,921	0,0129		
	0,199	0,096	0,148	0,025			0,888		0,674	0,781	0,0092		
	0,923	0,1	0,512	0,087			1,047	0,782		0,915	0,0031		
	0,48	0,095	0,288	0,049			0,649		0,892	0,771	0,0047		
	0,137	0,112	0,125	0,021			0,951	1,04		0,996	0,0139		
	0,112	0,114	0,113	0,019			0,801		0,46	0,631	0,0097		
Intestino anterior	0,22	0,215	0,218	0,037	<b>0,062</b>	<b>0,039</b>	0,781		0,739	0,760	0,0061	<b>0,0042</b>	<b>0,003</b>
	0,802	0,123	0,463	0,078			0,563	0,457		0,510	0,0019		
	0,68	0,132	0,406	0,069			0,492	0,409		0,451	0,0019		
	1,223	0,129	0,676	0,115				0,531	0,518	0,525	0,0013		
	1,277	0,119	0,698	0,118				0,346	0,336	0,341	0,0008		
	0,116	0,12	0,118	0,020				0,445	0,537	0,491	0,0072		
	0,582	0,366	0,474	0,080			0,294	0,49	1,006	0,597	0,0022		
	0,118	0,122	0,120	0,020			0,541	0,561	0,713	0,605	0,0087		
	0,126	0,127	0,127	0,021			0,332	0,61	0,681	0,541	0,0074		
Intestino medio	0,135	0,679	0,407	0,064	<b>0,049</b>	<b>0,036</b>	1,157		1,104	1,131	0,0052	<b>0,0038</b>	<b>0,0025</b>
	0,253	0,123	0,188	0,029			0,275	0,476	0,295	0,349	0,0035		
	0,15	0,13	0,140	0,022			0,444		0,166	0,305	0,0041		
	0,17	0,625	0,398	0,062			0,344	0,472	0,262	0,359	0,0017		
	0,679	0,925	0,802	0,125			0,298		0,271	0,285	0,0007		
	0,111	0,128	0,120	0,019			0,586	0,541		0,564	0,0089		
	0,178	0,129	0,154	0,024			0,385	0,322	0,231	0,313	0,0038		
	0,113	0,131	0,122	0,019			0,337	0,252	0,377	0,322	0,0050		
	0,872	0,13	0,501	0,078			0,219	0,385	0,257	0,287	0,0011		

**Tabla 16.** Datos de lecturas de absorbancia y AChE, ejemplares correspondientes al lado sin microplástico.

Segmento	Proteínas						AChE						
	Abs/min (1)	Abs/min (2)	Abs/min (mean)	mg/ml	mean	sd	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Abs (mean)	nmol/min x mg protein	Mean	SD
Buche/ molleja	0,578	0,111	0,345	0,058	<b>0,075</b>	<b>0,026</b>	0,514	0,54	0,817	0,624	0,0031	<b>0,0029</b>	<b>0,0029</b>
	0,634	0,498	0,566	0,096			0,859	0,743	0,696	0,766	0,0023		
	1,068	0,365	0,717	0,121			0,374	0,377	0,572	0,441	0,0011		
	0,421	0,429	0,425	0,072			0,528	0,377	0,571	0,492	0,0020		
	0,435	0,097	0,266	0,045			1,217	1,323	0,145	0,895	0,0058		
	0,741	0,114	0,428	0,072			0,715	1,755		1,235	0,0050		
	1,072	0,116	0,594	0,101			0,387	0,427		0,407	0,0012		
	0,414	0,114	0,264	0,045			0,583	0,656		0,620	0,0041		
	0,688	0,116	0,402	0,068			0,325	0,385	0,235	0,315	0,0014		
Intestino anterior	0,197	0,26	0,229	0,039	<b>0,037</b>	<b>0,012</b>	0,904	0,728	0,984	0,872	0,0066	<b>0,0068</b>	<b>0,0039</b>
	0,266	0,161	0,214	0,036				0,344	0,227	0,286	0,0023		
	0,599	0,123	0,361	0,061			0,902		0,842	0,872	0,0042		
	0,31	0,119	0,215	0,036			1,297	1,175	1,149	1,207	0,0098		
	0,209	0,119	0,164	0,028			1,049	1,035	1,377	1,154	0,0122		
	0,125	0,099	0,112	0,019			0,616	0,672		0,644	0,0100		
	0,311	0,124	0,218	0,037				1,094	0,963	1,029	0,0082		
	0,319	0,123	0,221	0,037			0,175	0,188	0,163	0,175	0,0014		
Intestino medio	0,298	0,359	0,329	0,051	<b>0,046</b>	<b>0,023</b>	0,549	0,54	0,422	0,504	0,0029	<b>0,0054</b>	<b>0,0054</b>
	0,149	0,178	0,164	0,026			0,169	0,314		0,242	0,0028		
	0,963	0,133	0,548	0,086			1,004	1,776	0,839	1,206	0,0041		
	0,187	0,13	0,159	0,025			1,295	1,682	1,126	1,368	0,0162		
	0,287	0,167	0,227	0,035			0,556	0,31		0,433	0,0036		
	0,16	0,54	0,350	0,055			0,341	0,339	0,729	0,470	0,0025		