

Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	8	103-118	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	---	---------	---	-------------------	----------------

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

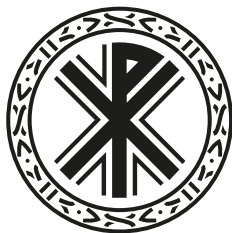
Fecha de recepción y aceptación: 28 de septiembre de 2015, 2 de noviembre de 2015

María Martín-Villamil¹, Javier Torres Gavilá^{1*} e Inmaculada Varó Vaello²

¹ Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnológicas. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Departamento de Biología, Cultivo y Patología de Especies Marinas. Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Ribera de Cabanes. Castellón.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnológicas. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. E-mail: javier.torres@ucv.es



RESUMEN

En la actualidad se utiliza a diario gran cantidad de productos con parabenos en su composición. Debido a su uso masivo, cada vez se detectan mayores cantidades de parabenos en medios acuáticos, incluidos los medios marinos e hipersalinos. En este estudio se analiza la toxicidad de un contaminante emergente, como es el metilparabeno (MeP), en *Artemia franciscana*, dada la presencia de este compuesto en zonas costeras y salinas mediterráneas. Para ello, se determinó la toxicidad aguda (LC_{50}), así como el efecto crónico (9 días) tras la exposición a dos concentraciones subletales (0,05 y 0,1 mg/L) sobre la supervivencia y el crecimiento. Además, se evaluó el efecto sobre actividad ChE y GST y *ratio* de RNA/DNA. Los resultados señalan que *A. franciscana* es resistente al MeP (LC_{50} -24 h = 131,4 mg/L). El metilparabeno afecta significativamente a la supervivencia y crecimiento en exposiciones crónicas a las concentraciones subletales ensayadas (0,05 y 0,1 mg/L). Además, estas causan alteraciones significativas de la actividad ChE, mientras que no se observa ningún efecto sobre la GST y la *ratio* RNA/DNA. Estos resultados indican que *A. franciscana* es resistente al MeP, aunque exposiciones crónicas (9 días) a concentraciones subletales sí producen cambios en supervivencia y crecimiento. Además, la inhibición de la ChE señala la capacidad neurotóxica del MeP. Los resultados se discuten en relación con su posible implicación en la biodiversidad del género *Artemia* y en el desarrollo la acuicultura.

PALABRAS CLAVE: parabenos, *A. franciscana*, toxicidad, biomarcadores.

ABSTRACT

Nowadays many products with parabens in its composition are used daily. Because of its widespread use, increasing amounts of parabens are found in aquatic environments, including marine and hypersaline environments. In this study, the toxicity of an emerging pollutant, such as methylparaben (MeP), is analyzed in *Artemia franciscana*, due its presence in coastal areas and marine saltworks in the Mediterranean region. For that, we tested MeP acute toxicity (LC_{50}), and their chronic effect (9 days) was evaluated by measuring survival and growth under two sublethal concentrations (0.05 and 0.1 mg/L). Also, the effect on ChE and GST activities and RNA/DNA ratio was assessed. *A. franciscana* are resistant to MeP (LC_{50} -24 h = 131.4 mg/L). Methylparaben significantly affects survival and growth in chronic exposure to sublethal concentrations tested (0.05 and 0.1 mg/L). In addition, they cause significant alterations in ChE activity, while no effect on glutathione-S-transferase activity and RNA/DNA ratio were found. These results indicate that *A. franciscana* is resistant to MeP, although chronic exposures (up to 9 days) to sublethal concentrations affect survival and growth. Furthermore, the inhibition of ChE point out the neurotoxicity capability of MeP. We discuss the implications of our results on *Artemia* genus biodiversity and aquaculture development.

KEYWORDS: parabens, *A. franciscana*, toxicity, biomarkers.



INTRODUCCIÓN

Los parabenos (PB) son ésteres del ácido hidroxibenzoico (*p*-AHB) que se comenzaron a usar a mediados de 1920 como conservantes antimicrobianos en productos farmacéuticos [1] y pronto expandieron sus utilidades a la industria cosmética y la alimentación [2]. Estas sustancias difieren en la longitud de la cadena del grupo alquilo, y se diferencian dos categorías: los parabenos de cadena corta (metilparabeno y etilparabeno) y los de cadena larga (propilparabeno, isopropilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno y bencilparabeno) [1, 3]. Estos pueden ser producidos sintéticamente, por esterificación del *p*-AHB con un alcohol y en presencia de un catalizador, o por ciertos organismos como bacterias y plantas [4]. Estos compuestos son moderadamente solubles en agua (desde 160 mg/L para el benzilparabeno (BzP) hasta 2.500 mg/L para el metilparabeno (MeP) a 25 °C), solubilidad que disminuye con el aumento de la longitud de la cadena. Por el contrario, la toxicidad aumenta conforme aumenta la longitud de la cadena del éster [3].

Los parabenos son considerados conservantes ideales porque tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, principalmente en bacterias gram-positivas, levaduras y moho [3]. Además, son altamente estables en lo que se refiere a la variación del pH, relativamente seguros de utilizar y tienen bajos costes de producción [1, 4]. Sin embargo, ciertos estudios sugieren que pueden actuar como disruptores endocrinos, al presentar actividades estrogénicas [5, 6, 7].

Los parabenos se utilizan principalmente como conservante en cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos, así como en productos de consumo industriales, como cigarrillos, barnices y pegamentos [1]. Además, recientemente se han encontrado PB en multitud de productos de papel, tales como billetes, periódicos y, en especial, en toallitas sanitarias antimicrobianas, siendo el MeP el éster predominante en estos productos [8, 9].

Actualmente no hay regulaciones con respecto a la presencia de parabenos en el medio ambiente, particularmente, en el medio acuático y en aguas residuales [3]. Sin embargo, el MeP es una de las sustancias controladas por el reglamento REACH, mientras que los demás parabenos solo se registran en la lista de candidatos REACH [10].

El uso masivo de productos que contienen parabenos genera unos residuos ricos en estas sustancias, y son mayores las descargas residuales en zonas costeras o ríos, próximas a fábricas de productos que usan estos componentes [11, 12]. Las descargas procedentes de fábricas, hospitales, así como de las plantas de tratamientos de efluentes residuales, constituyen una fuente directa y muy importante de contaminación acuática ambiental por PB. Aunque estos compuestos se encuentran en el aire, en suspensión y en los suelos [4], predominan en la fase acuosa (>97%) debido a su moderada solubilidad en agua [13]. Los patrones de distribución de PB en los diferentes compartimentos acuáticos (ej. aguas superficiales, biota o sedimentos) varían según la composición de los productos comerciales basados en estos compuestos destinados a uso diario, con una marcada predominancia de MeP sobre propilparabeno (PrP) y el resto de PB [3].

En ecosistemas acuáticos, incluidos los ecosistemas hipersalinos (lagos, lagunas y salinas), se detectan concentraciones de MeP que van desde unas pocas decenas [5, 14, 15, 16, 17], hasta varias centenas de ng·L⁻¹ [18], e incluso se han llegado a encontrar concentraciones de 1.062 ng·L⁻¹ en el delta del río Perla, en Guangzhou, al sur de China [18]. En ocasiones, también se ha detectado la presencia de MeP en zonas costeras y salinas españolas debido a la llegada de las aguas residuales procedentes de plantas depuradoras [19].

La permeabilidad de los parabenos a través de la piel de los organismos y su asimilación en los tejidos disminuyen al aumentar la longitud de la cadena del éster, así como con la formulación del producto [20]; el MeP es el que se detecta mayoritariamente en organismos acuáticos. Estudios realizados en peces salvajes de todo el mundo encuentran altas concentraciones de parabenos, especialmente de MeP (hasta un 80%), en sus tejidos [20], lo que muestra una presencia ubicua de estos compuestos en el medio acuático. Además, los niveles detectados son mayores en peces adultos que en juveniles, más del doble, lo que señala la bioacumulación de estos compuestos. Estudios recientes revelan que los PB provocan toxicidad aguda [21] y crónica en invertebrados acuáticos [22, 23].

La presencia de estos compuestos en ecosistemas hipersalinos hace necesario realizar un estudio exhaustivo sobre los riesgos y efectos de los PB, y en particular el MeP, en los organismos que viven en ellos, como es el caso de *Artemia*.

Artemia es el crustáceo más abundante y un organismo clave en el funcionamiento de estos ecosistemas. Las especies del género *Artemia* están distribuidas por todo el planeta, con excepción del continente antártico. Estas se caracterizan por habitar biotopos hipersalinos, con escasa diversidad animal y vegetal, y con una limitada presencia de predadores. La salinidad es el factor externo más importante que condiciona tanto su desarrollo y reproducción como la dinámica de sus



poblaciones. En general, los umbrales térmicos máximo y mínimo de supervivencia para este género se sitúan entre 5 y 35 °C, aunque estos límites no son fijos y varían según cada especie y población [24]. Además, *Artemia* debe hacer frente de forma habitual a un medio con una escasa cantidad de oxígeno disponible, con constantes situaciones de hipoxia (concentraciones menores de 2 ml O₂·L⁻¹) y anoxia.

La expansión de la acuicultura a escala mundial ha provocado la aparición de problemas relacionados con la pérdida de biodiversidad del género en algunas de las regiones en las que se está desarrollando esta actividad. La consecuencia inmediata de este incremento es el aumento del tráfico comercial de quistes de *Artemia* con destino a la acuicultura. La especie bisexual *Artemia franciscana* –procedente del Great Salt Lake (Utah, EE. UU.) y de las salinas de la bahía de San Francisco (California, EE. UU.)– se está utilizando de forma generalizada como alimento vivo para larvicultura en todo el mundo. Como consecuencia, dicha especie se ha introducido, intencionadamente o no, en ecosistemas hipersalinos distribuidos por todo el planeta; se considera ya como especie invasora y pone en peligro el estatus de distribución biogeográfica y de biodiversidad existente entre las especies autóctonas del área mediterránea. En Europa se han detectado poblaciones de esta especie en España, Portugal, Francia e Italia [25]. Otro factor de introducción de esta especie es la actividad de explotación salinera, donde permite la eliminación de microalgas, bacterias y materia orgánica particulada existente en las salmueras gracias a su actividad como organismo filtrador no selectivo, que ingiere partículas en un rango de tamaño de 10 a 50 µm [24, 26], garantizando así la obtención de sal de mayor calidad [25].

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

En los últimos años se está utilizando *Artemia* como organismo modelo en estudios de ecotoxicología en medios marinos e hipersalinos de contaminantes emergentes como son los compuestos farmacéuticos y las nanopartículas [27, 28]. Su uso como organismo modelo se debe a que presenta una serie de características como son el amplio conocimiento que se tiene de su biología, que es un organismo que se adapta muy bien a las condiciones de laboratorio, y con un ciclo de vida muy corto; además, su tamaño pequeño permite reducir los volúmenes en los ensayos de toxicidad. Estas características, junto con la facilidad de obtener sus nauplios (primera fase de desarrollo) listos para realizar ensayos de toxicidad, a partir de la eclosión de los quistes en muy pocas horas, la han convertido en un organismo idóneo para estudiar la toxicidad de xenobióticos en medios marinos e hipersalinos.

Las distintas poblaciones de *Artemia* pueden fijar los contaminantes presentes en el medio por filtración, o adherirse a su cuerpo debido a la hidrofobicidad que presenten [3], lo que las convierte en un vector de transmisión de dichos contaminantes a niveles superiores de la cadena trófica, tanto natural como artificial [29, 30]. *Artemia* tiene la ventaja de poder ser utilizada en los ensayos de toxicidad como una sola especie, en comparación con otras especies del género, o con poblaciones de la misma especie en estudios más amplios, lo que permite obtener interpretaciones más holísticas de los riesgos relacionados con los ecosistemas globales [30].

La contaminación de ecosistemas acuáticos favorece la pérdida de biodiversidad, y en especial la del género *Artemia* en los ecosistemas hipersalinos, caracterizados ya por su baja biodiversidad. Este hecho apunta a la necesidad de estudiar los efectos y los riesgos derivados de la presencia de contaminantes en dichos ecosistemas, especialmente los emergentes, como los parabenos y las nanopartículas, sobre las especies y/o poblaciones de *Artemia* que los habitan.

El uso de biomarcadores se ha convertido en una herramienta útil en ecotoxicología para evaluar los efectos de la contaminación química en el medio ambiente. Entre los marcadores bioquímicos más utilizados se encuentran las alteraciones enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo (ej. la enzima glutatión-S-transferasa [GST]) y la inhibición de las colinesterasas (ChEs).

El análisis de la actividad de la ChE se usa como indicador de neurotoxicidad [27, 31]. La ChE es una enzima asociada con el sistema nervioso colinérgico cuya función consiste en finalizar la transmisión sináptica hidrolizando la acetilcolina (ACh), neurotransmisor en muchas sinapsis, especialmente en las neuronas motoras. En organismos filtradores como *Artemia*, la inhibición de la ChE, por ejemplo, se traduce en una disminución de la actividad motora del individuo, que



altera importantes funciones fisiológicas, como la respiración, la natación y la alimentación, entre otras, y puede llegar a ocasionar la muerte de los individuos.

La enzima glutatión-S-transferasa (GST) está involucrada en la fase II de los procesos de biotransformación, combinando las moléculas resultantes de la fase I, incrementando su solubilidad y facilitando su excreción. Es una enzima de gran importancia en mecanismos de detoxificación celular de xenobióticos o sustancias nocivas para las células [27].

Además, la ratio RNA/DNA es otro biomarcador de uso habitual como indicador de la tasa de crecimiento y estado nutricional en las primeras fases de desarrollo de los organismos [32, 33, 34].

Objetivos

A pesar de la presencia de compuestos como el MeP en ecosistemas acuáticos, incluidos los hipersalinos, son muy escasos los estudios sobre su toxicidad en invertebrados acuáticos; o no existen como en el caso del género *Artemia*. El objetivo del presente estudio ha sido analizar la toxicidad de un contaminante emergente como el MeP en la especie bisexual *A. franciscana* para evaluar el posible nivel de riesgo que supone la presencia de este compuesto en el medio sobre sus poblaciones, así como para la biodiversidad del género, considerada ya como especie invasora en la región mediterránea, y como el recurso natural explotable imprescindible y limitante para el desarrollo de la acuicultura a nivel mundial. Para ello, se ha realizado un diseño experimental con el fin de determinar la toxicidad aguda (LC_{50}) del MeP. Además, se ha analizado el efecto crónico, tras la exposición a concentraciones subletales durante nueve días, sobre la supervivencia y sobre algunos procesos fisiológicos importantes mediante la determinación de biomarcadores como la ChE, GST y ratio RNA/DNA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Organismos

Se utilizaron individuos de la especie bisexual americana *A. franciscana*. Se emplearon quistes deshidratados comerciales de la casa INVE (Bélgica), que se eclosionaron siguiendo el procedimiento descrito en Amat (1985) [35] y Medina (2012) [24]. Así, una vez pesados los quistes (0,150-0,202 g), se hidrataron en agua de mar ($37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) en tubos cilindrocónicos de 1 l de capacidad, dotados de un sistema de aireación individual por burbujeo de aire desde el fondo, mantenidos en baño termostatzado a 28°C y expuestos a una iluminación constante de 1.000 lux. Los nauplios recién eclosionados (instar I) fueron separados de los no eclosionados, cáscaras y muertos, gracias a su fototropismo positivo.

Compuesto químico

Se utilizó el metilparabeno (MeP; $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$; número CAS: 99-76-3) de la casa SUPELCO, que fue suministrado por SIGMA. La elección del compuesto de basó en su uso habitual como conservante en cosmética y en productos de consumo entre la población, lo que origina una presencia cada vez mayor en el medio acuático.

Test de toxicidad aguda: determinación de LC_{50}

Para determinar la toxicidad del MeP se calculó la concentración letal 50 (LC_{50}), definida como la concentración a la cual mueren el 50% de los individuos expuestos a un compuesto tóxico en un tiempo de exposición determinado.



El ensayo de toxicidad se llevó a cabo según Sarabia (2002) [36], con algunas modificaciones, evaluando la mortalidad de los nauplios de *Artemia* de 24 horas de vida (instar II-III). El ensayo consistió en la exposición a seis concentraciones crecientes de MeP, además de un grupo control (C, expuesto a agua de mar esterilizada) y un grupo control acetona (CA), consistente en agua de mar esterilizada y con una concentración de acetona igual a la presente en la concentración más alta de MeP ensayada (1,69%) [37]. Estas se prepararon a partir de un stock de 1.000 mg/L (mg/L) en agua de mar esterilizada. Para facilitar la disolución del MeP en agua de mar se utilizó acetona pura (3 ml/100 ml). A continuación se realizaron diluciones seriadas para obtener el rango de concentraciones deseado. Tras varios ensayos de tanteo, se acotó el intervalo de exposición entre 100 y 562,34 mg/L, y se decidió exponer a los individuos a las siguientes concentraciones nominales de tóxico, basadas en una escala Log_{10} : 10, 100, 141,25, 199,52, 316,2, 562,34 mg/L.

Para realizar los ensayos de toxicidad se utilizaron placas multipocillo (Multiwell ®) de doce pocillos con 5 ml de capacidad máxima. En cada pocillo se expusieron 10 ± 2 nauplios instar II-III. La exposición a las distintas concentraciones y controles (C y CA) se realizó por triplicado. A su vez, todo el procedimiento se llevó a cabo por duplicado, con lo que se obtuvieron seis réplicas por tratamiento con un total de aproximadamente sesenta individuos expuestos por concentración ensayada. Los nauplios se mantuvieron durante 24 horas en una cámara de incubación termostatzada a una temperatura constante de 25 ± 1 °C y en total oscuridad. Durante el tiempo de exposición no se suministró alimento a los nauplios.

Transcurridas 24 horas de exposición, se contaron los individuos muertos con ayuda de una lupa binocular. Los individuos que mostraban movimiento nulo se consideraron como muertos, entendiendo como movimiento nulo el hecho de que un organismo no varíe su posición durante cinco segundos [38].

Ensayo de toxicidad crónica

A partir del valor de la LC_{50} a las 24 h, se eligieron dos concentraciones subletales (0,05 y 0,1 mg/L) para realizar el estudio de toxicidad crónica. Se hicieron dos réplicas de cada tratamiento (C, CA, 0,05 y 0,1 mg/L) utilizando recipientes de vidrio de 800 ml de capacidad total. El volumen del medio de exposición fue de 250 ml. El número de individuos total expuesto en cada tratamiento fue de aproximadamente 1.000 individuos, a una densidad de 3-5 nauplios $\cdot \text{ml}^{-1}$. La renovación de medio fue completa cada día de toma de muestras (2, 5, 7 y 9 días). La experiencia se llevó a cabo en una cámara termostatzada a una temperatura constante de 25 ± 1 °C, con fotoperiodo doce horas luz-doce horas oscuridad. Y como alimento se usó la microalga *Tetraselmis suecica*.

Desde el comienzo del ensayo se tomaron muestras de cada tratamiento, por triplicado, a diferentes edades, para su posterior análisis, variando el número de individuos según la edad o días de exposición: 200 individuos de 24 horas de vida, 150 a los dos días de exposición, 75 a los cinco días, 50 a los siete días y 10 a los nueve días. Las muestras se recogieron en tubos Eppendorf en su tampón correspondiente (tampón fosfato (TF) o tampón Tris-EDTA (TE)) al ensayo que realizar, y almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

Para ajustar el alimento en los ensayos, se llevó a cabo un control de la densidad del cultivo microalgal (*T. suecica*) mediante el recuento del número de células en una cámara de Neubauer (hematocitómetro). Al tratarse de células móviles, previamente se fijaron las muestras con una solución de yodo (lugol) para facilitar su recuento [24].

Preparación de las muestras

Para preparar las muestras, estas se descongelaron y homogenizaron en frío manualmente, en un volumen de tampón mínimo (50-100 μl) con ayuda de una varilla de plástico para Eppendorf. Para disgregar bien las muestras se sonicaron durante dos minutos, y se enrasó el volumen con el tampón correspondiente hasta 500 μl . A continuación se centrifugaron a 10.000 g durante quince minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se descartó el pellet recogiendo el sobrenadante y se repartió en alícuotas para la determinación de los diferentes biomarcadores. Todas las alícuotas se congelaron a -80 °C hasta su análisis.



Supervivencia y crecimiento

Para el seguimiento del crecimiento y la supervivencia se separaron, para cada uno de los tratamientos y por triplicado, 20 ± 1 nauplios instar II-III (24 horas de vida) y se dispusieron en tubos tipo *corning* de 50 ml, enrasados hasta 30 ml con la correspondiente solución. El control del crecimiento y supervivencia se llevó a cabo a diferentes tiempos de exposición, expresados en días: 0, 2, 5, 7 y 9. Los individuos utilizados para determinar la talla (mm) no fueron devueltos ni repuestos. Cada día de control se renovó completamente el medio. Para estimar la talla se separaron diez individuos por cada tratamiento en una placa de Petri pequeña, los cuales fueron anestesiados con agua saturada de cloroformo y medidos con ayuda de la lupa binocular.

Para determinar la supervivencia se contaron los individuos muertos respecto al total de organismos expuestos en cada tratamiento. Los individuos que mostraban movimiento nulo durante al menos diez segundos se consideraron como muertos. El porcentaje de mortalidad se calculó como el número de individuos muertos/total expuestos por tratamiento $\cdot 100$.

Determinación de biomarcadores

Colinesterasa

Para determinar la actividad de la enzima colinesterasa (ChE), se realizó un ensayo basado en el método Ellman *et al.* (1961) [39], adaptado a microplaca siguiendo el procedimiento descrito en Varó *et al.* (2015) [37], y usando ATC (acetiltiocolina) como sustrato.

El ensayo se realizó en microplaca de 96 pocillos. La actividad ChE se determinó en 100 μ l de cada muestra, por triplicado, que se mezcló con 200 μ l de la “solución de reacción (SR)” preparada en fresco con: 100 mM TF, (pH 7,4, con 150 mM KCL), 0,75 mM ATC y 10 mM DTNB (5,5'-ditio-bis (2-dinitrobenzoico). Para el blanco se utilizaron 100 μ l de TF. La reacción fue medida cinéticamente a una longitud de onda de 415 nm en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution), a 25 °C durante quince minutos (un ciclo por minuto), tras un periodo de incubación previo de quince minutos en oscuridad. La actividad ChE fue expresada como nanomoles del sustrato hidrolizado por minuto por microgramo de proteína (nmol/min $\cdot$ μ g proteína).

Glutación-S-transferasa

El ensayo de GST, basado en Habig (1974) [40], se realizó en microplaca siguiendo el procedimiento descrito en Solé *et al.* (2015) [41]. Para medir la actividad GST se pipetearon 50 μ l de muestras por triplicado, que se mezclaron rápidamente con 175 μ l de “solución de reacción” preparada en fresco con TF (100 mM pH 7,4, con 150 mM KCL) que contenía 1 mM de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno) y 1 mM GSH (glutación reducido). Para el blanco se utilizaron 50 μ l de TF, por triplicado. A continuación, la reacción fue medida cinéticamente a una longitud de onda de 340 nm en un lector de microplaca TECAN (Ultra Evolution) a 25 °C, durante quince minutos (un ciclo por minuto). La actividad GST fue expresada como nanomoles del sustrato hidrolizado por minuto por microgramo de proteína.

Ratio RNA/DNA

El contenido de RNA y DNA en cada muestra se determinó según el método descrito por Varó *et al.* (2007) [42] usando el kit de “RiboGreen™ RNA Quantitation Kit” y el “PicoGreen™ DNA Quantitation Kit” respectivamente (Molecular Probes). El tampón de homogenización utilizado en este caso fue tampón TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA; pH 7,5).



Para cuantificar el RNA de las muestras se utilizó una curva patrón con concentraciones crecientes de RNA entre 0 y 2.000 ng·ml⁻¹. En el ensayo de RNA, se pipeteó 1 µl de DNasa I (1x) a cada pocillo y se añadieron 50 µl de muestra diluida (1/40) o patrón (por triplicado). Tras un periodo de incubación de una hora a 37 °C, se añadieron a todos los pocillos 50 µl de tampón TE y 100 µl de *Ribogreen* diluido 200x. La cantidad de RNA se obtuvo midiendo la fluorescencia a unas longitudes de onda de 485 nm de excitación y 535 nm de emisión en un lector de microplaca Tecan (Ultra Evolution), tras un periodo de incubación de cinco minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La cantidad de RNA de las muestras fue expresada en µg RNA·ml⁻¹ a partir de la curva patrón.

Por otro lado, el contenido de DNA de cada muestra se determinó a partir de una curva patrón con concentraciones crecientes de DNA entre 0 y 2.000 ng·ml⁻¹. En el ensayo de DNA, se pipetearon 10 µl de RNasa I (1/400) a cada pocillo y se añadieron 50 µl de muestra diluida (1/4) o patrón (por triplicado). Tras un periodo de incubación de una hora a 37 °C, se añadieron a todos los pocillos 50 µl de tampón TE y 100 µl de *Picogreen* diluido 200x. La cantidad de DNA se obtuvo midiendo la fluorescencia a unas longitudes de onda de 485 nm de excitación y 535 nm de emisión en un lector de microplaca Tecan (Ultra Evolution) tras un periodo de incubación de cinco minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La cantidad de DNA de las muestras fue expresada en µg DNA·ml⁻¹ a partir de la curva patrón.

Proteína total

El contenido de proteína total en cada muestra se determinó por el método de Bradford [43] adaptado a microplaca [37], utilizando el kit comercial de Bio-Rad y albúmina bovina pura (BSA) como estándar. Para la curva patrón se utilizaron concentraciones crecientes de BSA entre 0 y 300 µg·ml⁻¹.

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

Análisis estadístico

El efecto del MeP sobre la supervivencia se analizó mediante el test de Logrank (Mantel-Cox) para múltiples comparaciones de curvas de supervivencia. La LC₅₀ y sus intervalos de confianza se obtuvieron mediante el ajuste de regresión Probit.

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

El efecto debido a los factores tratamiento y tiempo de exposición se evaluó mediante un análisis factorial univariado de varianza de dos factores (ANOVA de dos vías). Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba de Bonferroni *post hoc* para las variables con varianzas homogéneas, mientras que para varianzas heterogéneas se utilizó la prueba T3 de Dunnett para la comparación múltiple de medias. El nivel de significación se estableció a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$ para las pruebas *post hoc* y la normalidad y homogeneidad, respectivamente. Los valores se presentan como media $\pm$ desviación estándar (std). El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software IBM SPSS Statistics para el análisis de la talla, LC₅₀ y de biomarcadores, y con el programa PRISM para el de supervivencia.

RESULTADOS

El grupo experimental expuesto a 0,1 mg/L de MeP tras nueve días sufrió una mortalidad del 100%, por tanto no se pudo llevar a cabo la determinación de los biomarcadores estudiados.

Es importante destacar que aunque en las figuras aparezca un grupo llamado “0 días de exposición”, no fue incluido en el análisis estadístico. Este grupo está formado por un conjunto de diez individuos del grupo control (agua de mar



estéril), medidos y/o analizados con 24 horas de vida, y es un grupo de referencia de partida para la talla y los diferentes biomarcadores (excepto para ChE) a tiempo 0 h de exposición (24 horas de vida).

Test de toxicidad aguda

El valor de LC_{50} y sus intervalos de confianza obtenidos mediante el ajuste de regresión Probit para nauplios de *A. franciscana* expuestos durante 24 horas a MeP fue de 131,4 (87,4-169,15) mg/L.

Supervivencia y crecimiento

El efecto del MeP sobre la supervivencia de *A. franciscana* tras nueve días de exposición a concentraciones subletales se presenta en la figura 1. Los resultados del test de Logrank para múltiples comparaciones de curvas de supervivencia evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo control y el resto de los tratamientos, los cuales no presentaron diferencias entre sí.

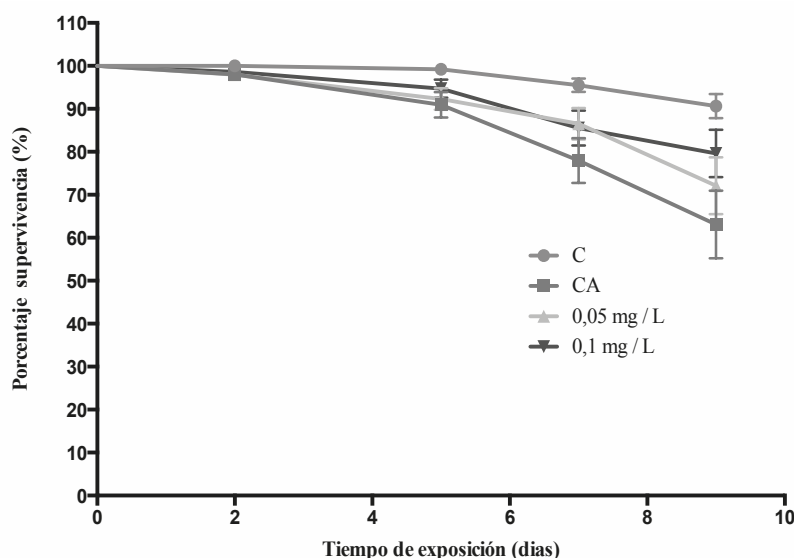


Figura 1. Curvas de supervivencia de *A. franciscana* a lo largo de nueve días de exposición a los diferentes tratamientos: C (control), CA (Control acetona), 0,05 y 0,1 mg/L de MeP.

La talla de los cuatro grupos analizados a lo largo del tiempo se presenta en la figura 2. Se encontraron diferencias significativas tanto por el efecto tiempo de exposición como por el tratamiento y su interacción (ANOVA dos vías, $p \leq 0,05$). El modelo explica un 71,6% de la varianza (R^2 corregida = 0,716).

La prueba *post hoc* T3 de Dunnet, para varianzas heterogéneas, mostró como grupo homogéneo el compuesto por CA, 0,05 y 0,1 mg/L de MeP y significativamente diferente ($p \leq 0,05$) con respecto al control (C) en cuanto a tratamiento; y diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tiempo de exposición.

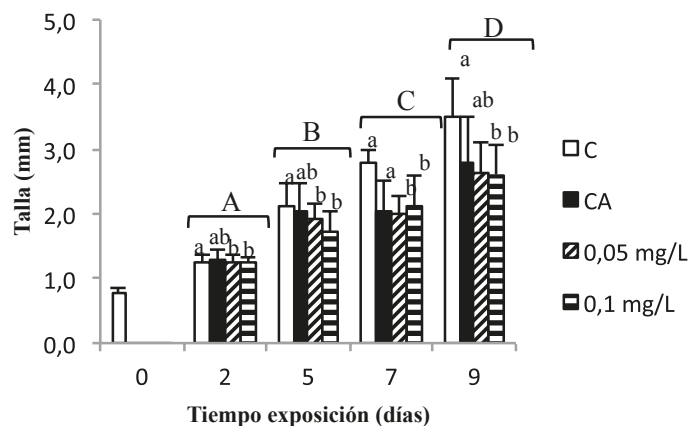


Figura 2. Variación de talla a lo largo del tiempo en los diferentes grupos experimentales: C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 mg/L de MeP. Las letras mayúsculas (A, B, C, D) señalan diferencias significativas entre grupos en función del tiempo de exposición; las letras minúsculas (a, b) muestran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

Biomarcadores

Colinesterasa

En la figura 3 se muestra la actividad de la enzima ChE en *Artemia* a diferentes tiempos de exposición (de 2 a 9 días) y tratamientos con MeP. La variable cumplió las premisas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Los resultados del análisis de varianza de dos vías reveló diferencias significativas en todos los factores (tiempo y tratamiento), así como en su interacción (ANOVA dos vías, $p \leq 0,05$). La comparación múltiple de Bonferroni permitió agrupar las respuestas en dos subconjuntos homogéneos en ambos factores. Por un lado, el grupo CA fue significativamente diferente ($p \leq 0,05$) al grupo expuesto a 0,05 mg/L de MeP, siendo este último el que presentó el valor más bajo de actividad ChE. Por otro lado, en función del tiempo de exposición, a los 2 y 7 días de exposición la actividad ChE fue significativamente diferente de la que presentaron el grupo de 5 y 9 días ($p \leq 0,05$).



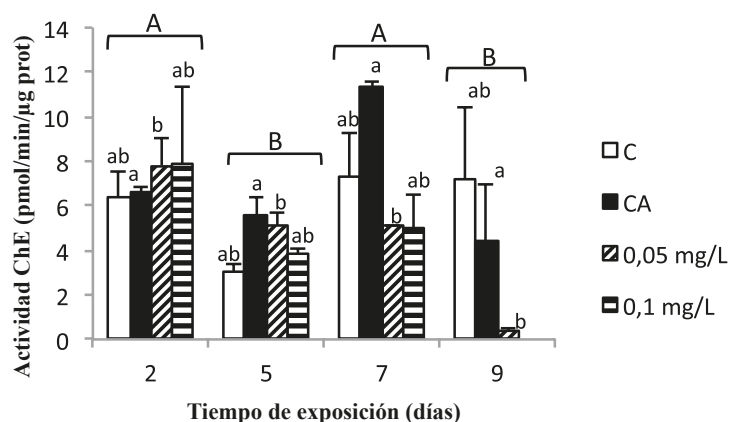


Figura 3. Efecto de los tratamientos sobre la actividad ChE a lo largo del tiempo de exposición. C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 mg/L de MeP. Las letras mayúsculas (A, B) señalan diferencias significativas entre grupos en función del tiempo de exposición; las letras minúsculas (a, b) muestran diferencias significativas según el tratamiento, de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de dos vías, y el test *post hoc* de Bonferroni ($p \leq 0,05$). Los datos que se muestran son las medias $\pm$ std (desviación estándar).

Glutación-S-transferasa

En la figura 4 se presenta la actividad de la enzima GST en los diferentes grupos analizados. La variable GST cumplió las premisas de normalidad (Shapiro-Wilk $p \geq 0,01$) rechazando la hipótesis de homogeneidad de varianzas (test de Levene, $p \leq 0,01$). La actividad de GST mostró diferencias significativas en función del tiempo de exposición y en la interacción de los dos factores analizados (tiempo de exposición y tratamiento) (ANOVA dos vías, $p \leq 0,05$). La prueba de comparación múltiple T3 de Dunnet permitió agrupar como subconjuntos homogéneos, por un lado, los grupos de 2 y 7 días de exposición, y, por otro, los grupos de 5 y 9 días, que fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) entre sí. El grupo de 7 días presentó la actividad más alta de GST, mientras que el valor más bajo le corresponde al grupo de 9 días. El factor tratamiento no mostró diferencias significativas entre pares de grupos experimentales analizados ($p \geq 0,05$).

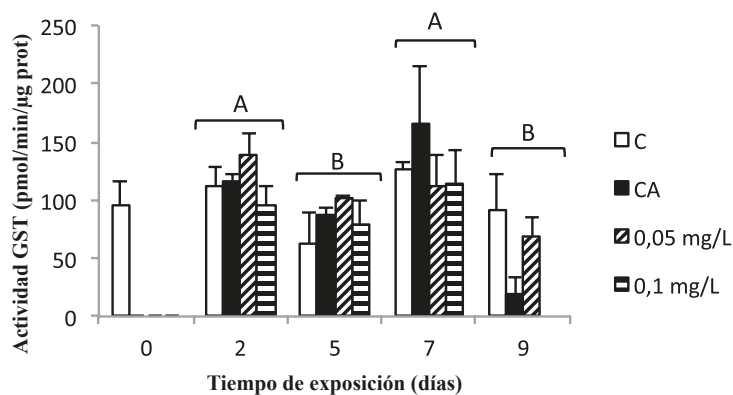


Figura 4. Efecto de los tratamientos sobre la actividad GST a lo largo del tiempo de exposición. C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 mg/L de MeP. Las letras mayúsculas (A y B) señalan diferencias significativas entre grupos en función del tiempo de exposición de acuerdo con el resultado del análisis de ANOVA de dos vías, y el test *post hoc* de Bonferroni ($p \leq 0,05$). Los datos que se muestran son las medias $\pm$ std (desviación estándar).

Ratio RNA/DNA

En la figura 5 se observa la relación RNA/DNA en función del tiempo de exposición a los diferentes tratamientos con MeP. No se observan diferencias significativas en ninguno de los factores estudiados (tiempo de exposición y tratamiento) (ANOVA dos vías, $p \geq 0,05$).

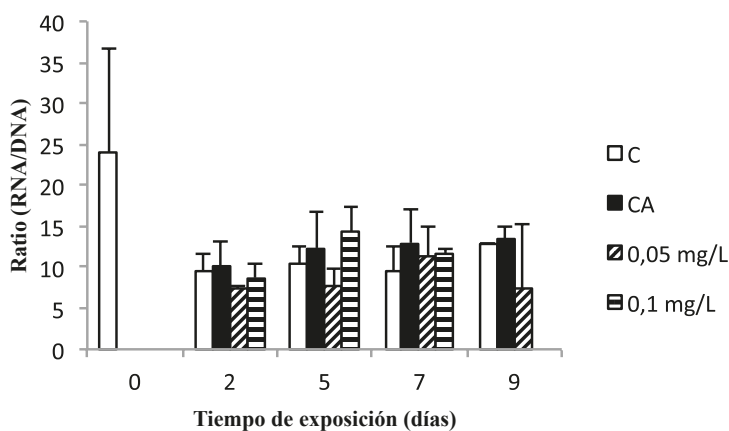


Figura 5. Variación de la relación RNA/DNA en función del tiempo de exposición a los diferentes tratamientos con MeP: C (control), CA (control acetona), 0,05 y 0,1 mg/L de MeP. Los datos que se muestran son las medias $\pm$ std (desviación estándar).

DISCUSIÓN

Los resultados de la exposición aguda indican que los nauplios de *A. franciscana* son poco sensibles al MeP, ya que el valor de LC_{50} a las 24 horas (131,4 mg/L) está por encima de 100 mg/L, rango que se considera como no tóxico para organismos acuáticos. Los niveles de toxicidad de los químicos para los organismos acuáticos se clasifican en: muy tóxico, $LC_{50} < 1$ mg/L; tóxico, LC_{50} 1-10 mg/L; perjudicial, LC_{50} 10-100 mg/L; y no tóxico, $LC_{50} > 100$ mg/L [44]. La relación entre la longitud de la cadena de los parabenos y su toxicidad ha quedado demostrada en numerosas ocasiones [21, 23, 45], siendo los menos tóxicos los de cadena corta, como es el caso de MeP. Ensayos con *Daphnia magna* expuesta a MeP [21, 45] indican que es perjudicial para dicho crustáceo (EC_{50} 41-62 mg/L), hecho que contrasta con la menor sensibilidad de *A. franciscana* al MeP en relación con *Daphnia*. Estudios previos de toxicidad aguda en diferentes especies de *Artemia* con pesticidas organofosforados [29, 37], o con compuestos emergentes como nanopartículas metálicas [46] o medicamentos [47], demuestran la gran resistencia del género *Artemia*, aunque la sensibilidad varíe entre las diferentes especies y poblaciones [36, 48]. De hecho, el MeP, si se compara con otros compuestos, es mucho menos tóxico que clorpirifos para *A. franciscana* (LC_{50} 24 h = 1,5 mg/L [29]), al igual que ocurre con medicamentos como diazepam (LC_{50} 48 h = 12,2 mg/L), ácido clofibrato (LC_{50} 48 h = 87,22 mg/L) o clofibrato (LC_{50} 48 h = 36,6 mg/L), y detergentes como dodecilsulfato sódico (LC_{50} = 12,2 mg/L) para *A. parthenogenetica* [47].

La exposición crónica durante nueve días de *A. franciscana* a 0,05 y 0,1 mg/L de MeP causa una mortalidad significativa con un rango de supervivencia de entre el 70 y el 80%. El solvente acetona (grupo CA) también afecta a la supervivencia, ya que produce una mortalidad de aproximadamente un 37%. Terasaki *et al.* (2015) [23] expusieron al crustáceo *Ceriodaphnia dubia* durante siete días a concentraciones de MeP mayores a las estudiadas en el presente trabajo y obtuvieron una supervivencia final muy superior (80-100%) a la encontrada aquí, lo que sugiere que *A. franciscana*, durante sus primeras fases de desarrollo, es más sensible a exposiciones crónicas de MeP que *C. dubia*. Esta última, a su vez, es más sensible que *D. magna* [22]. La supervivencia observada fue inferior a la registrada por otros autores con la misma especie de *Artemia* expuesta a clorpirifos [37]. En este trabajo, la supervivencia de *Artemia* a los diez días de exposición a concentraciones entre 10 y 100 veces menores a las ensayadas en el presente estudio fue superior al 80%. Nuestros resultados se asemejan más a los encontrados en dos especies de *Artemia* (*A. franciscana* y *A. parthenogenetica*) por Sukumaran y Grant (2013) [49], quienes utilizaron un compuesto genotóxico, el etil metano sulfonato (EMS). La supervivencia a los treinta días de exposición fue aproximadamente del 60%, excepto a la mayor concentración (160 mg/L), que fue del 18% aproximadamente.

El crecimiento se ve afectado por el MeP a partir de los cinco días de exposición, presentando diferencias significativas respecto al grupo control solo el expuesto a la máxima concentración utilizada (0,1 mg/L). A partir de los cinco días, los individuos expuestos a MeP, incluido CA, presentaron un crecimiento menor que el control, y es significativa la interacción de los dos factores analizados (tiempo de exposición y tratamiento). La talla (mm) aumentó con la edad (desarrollo) durante los nueve días de exposición de forma significativa en todos los tratamientos. Los mismos resultados se observaron en individuos de *Artemia*, incluyendo la especie *A. franciscana*, expuestos de forma crónica a otros compuestos, como clorpirifos y EMS (genotóxico) [37, 49].

La actividad enzimática colinesterasa (ChE) se ve afectada por los diferentes tratamientos estudiados. Así, a partir de los cinco días de exposición, la actividad ChE de los grupos CA y 0,05 mg/L presentaron diferencias respecto al control. Cabe destacar que la actividad más baja se ha encontrado en el grupo de 0,05 mg/L a los nueve días. La actividad ChE es frecuentemente utilizada como biomarcador clásico de neurotoxicidad en estudios de contaminación acuática [29]. Los efectos como consecuencia de la exposición a parabenos pueden ser de particular interés ecotoxicológico, ya que hasta hace unos años los compuestos neurotóxicos por excelencia eran los organofosforados y carbamatos.

Nuestros resultados confirman los obtenidos previamente en ensayos con otras especies de *Artemia*, en las cuales la actividad ChE se ve afectada tras la exposición a medicamentos y nanopartículas metálicas [27, 46, 50]. En el presente estudio, la actividad ChE del grupo control a las 48 horas ($6,37 \pm 1,18$ pmol·min⁻¹·µg proteína⁻¹) es superior (aproximadamente el doble) que la determinada en otros trabajos realizados por Varó *et al.* (2002) [29] y Nunes *et al.* (2006) [27] para ese mismo tiempo en *A. parthenogenetica* ($3,69 \pm 0,17$ nmol·min⁻¹·mg proteína⁻¹ y $3,72 \pm 1,81$ nmol·min⁻¹·mg



proteína⁻¹ respectivamente). Este hecho podría indicar una mayor resistencia de *A. franciscana* frente a la presencia en el medio de compuestos con potencial efecto neurotóxico, como MeP. Sin embargo, se observa que a los siete días se produce un aumento de la actividad de la ChE en el grupo control, contrariamente a lo descrito para esta misma especie por Varó *et al.* (2015) [37] y para otros crustáceos por Solé *et al.* (2006) [51], que describen una relación inversa de la actividad ChE con el desarrollo.

La exposición de *Artemia* a las concentraciones estudiadas de MeP no afecta a la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, el solvente (la acetona) causa una disminución significativa de la actividad GST en el grupo CA con respecto al control a los nueve días de exposición. Además, el único aumento de actividad GST (en todos los grupos tratados) se produce a los siete días de exposición y se presenta el valor más alto en el grupo CA. Dicho aumento puede ser un indicador de estrés oxidativo [46].

En este estudio la exposición de *A. franciscana* a MeP, al igual que ocurre con otros compuestos como nanopartículas metálicas y medicamentos, no afecta a la actividad GST [27, 46]. Este hecho puede deberse a que, además de los procesos metabólicos de detoxificación y eliminación de xenobióticos en *Artemia*, su excreción se pueda producir también a través de las branquias al agua circundante, con lo que aumenta su eliminación. La actividad GST determinada en *A. franciscana* a las 48 horas en el grupo control ($112,60 \pm 15,12$ pmol·min⁻¹·μg proteína⁻¹) fue aproximadamente el doble de la obtenida por Nunes *et al.* (2006) [27] para *A. parthenogenetica* ($66,07 \pm 34,22$ nmol·min⁻¹·mg proteína⁻¹). Esto podría indicar que la especie *A. franciscana* posee mecanismos más eficaces de detoxificación frente a xenobióticos que la especie asexual del género.

La exposición a MeP de *A. franciscana* no parece causar efecto alguno en la ratio RNA/DNA. Sin embargo, en peces, un estudio realizado en carpa común (*Cyprinus carpio*) encontró diferencias en los valores de la ratio en relación con el tipo de alimento. Así, la ratio RNA/DNA a los ocho días de vida varió desde $0,65 \pm 0,27$ hasta $1,10 \pm 0,18$ en función del alimento basado en dos especies de nematodos [34], observando que con el uso de alimento seco la ratio RNA/DNA ($1,35 \pm 0,26$) fue ligeramente menor que con *Artemia* ($1,54 \pm 0,15$). Otro estudio realizado en juveniles de *Sepia officinalis* [33] durante diez días demostró que mayores raciones de alimento se traducían en mayores valores de RNA/DNA y, por tanto, mayores tasas de crecimiento, con ratios de RNA/DNA que varían desde 0,91 para raciones pequeñas hasta 1,13 para las raciones grandes. Comparando con nuestros resultados de RNA/DNA obtenidos a la misma edad que en la carpa y en la sepia, que fueron de 9,66 y 9,31 a siete y nueve días de exposición respectivamente, se desprende que la tasa de crecimiento en los primeros estadios del desarrollo es mayor en *A. franciscana*. Además, las variaciones encontradas en dichos estudios y el hecho de que no se hayan encontrado diferencias entre el grupo control y los tratamientos con MeP en el presente trabajo podrían indicar que la presencia de un tóxico como MeP en el medio no condiciona la tasa de crecimiento, sino que el factor realmente más limitante sería la calidad nutricional del alimento [34].

Es importante destacar que la gran mayoría de los estudios de toxicidad realizados con parabenos se refieren a peces y mamíferos, los cuales incorporan los componentes tóxicos vía oral o intraperitoneal [52, 53, 54, 55]. Este hecho dificulta en gran medida la comparación de los datos obtenidos en nuestro estudio. La difusión pasiva a través de las branquias es una ruta de entrada predominante de los compuestos presentes en el medio para crustáceos [27], y en menor medida a través del alimento. Los animales utilizados en este estudio fueron expuestos a concentraciones de MeP mucho más elevadas de las que realmente se encuentran en el medio ambiente. Datos sobre las concentraciones ambientales de parabenos, incluido MeP, sugieren un riesgo muy bajo en la actualidad para organismos acuáticos, ya que las concentraciones que causan efectos nocivos son en general hasta 1.000 veces superiores a las encontradas en el medio natural [56]. En nuestro trabajo, el rango estudiado es 500-1.000 veces superior a los valores medios ambientales [16, 17, 18]. No obstante, hay que destacar que la presencia de otros contaminantes ambientales, ya sean fármacos u otros compuestos antropogénicos, puede contribuir de manera sinérgica a los efectos observados de MeP en *A. franciscana* [27].

En relación con los biomarcadores analizados se ha demostrado que la actividad ChE se ve inhibida por la presencia de MeP, indicando que es un biomarcador sensible frente a estos compuestos, y que presenta efecto neurotóxico. Mientras que la actividad GST y la ratio RNA/DNA no se ven afectadas por MeP.



CONCLUSIONES

El aumento de la presencia de contaminantes como el MeP en ecosistemas acuáticos marinos e hipersalinos indica la necesidad de realizar estudios que permitan valorar el efecto de dichos compuestos en *A. franciscana*, por tratarse de una especie clave de estos ecosistemas, además de ser esencial para la acuicultura. El MeP no es tóxico para esta especie de acuerdo con el valor de la LC_{50} -24h obtenido ($131,4 \text{ mg/L} > 100 \text{ mg/L} = \text{no tóxico}$; [44]). Sin embargo, la exposición crónica a concentraciones subletales de MeP ($0,05$ y $0,1 \text{ mg/L}$) durante nueve días afecta a la supervivencia y al crecimiento. En el caso del crecimiento, a nivel bioquímico, este efecto no se ve reflejado al no encontrarse un cambio significativo en la ratio RNA/DNA. Además, el MeP inhibe la actividad ChE, lo que indica el efecto neurotóxico de este compuesto. Por el contrario, no produce alteraciones significativas en la actividad de la GST.

Un aumento de las concentraciones de MeP en ecosistemas acuáticos hipersalinos, y/o su persistencia, puede suponer un riesgo ambiental real para ciertas poblaciones de invertebrados acuáticos, y en especial para *Artemia*, cuyas especies y poblaciones podrían disminuir, lo que implicaría una pérdida de biodiversidad para el género. Además, una disminución de las poblaciones de la especie *A. franciscana* en aquellos lugares en los que se explotan quistes puede ser un riesgo en el futuro para el desarrollo de la acuicultura debido a la disminución o pérdida de este recurso natural explotable.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. G. Soni, I. G. Carabin, G. A. Burdock, Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens), *Food Chem Toxicol.* **43** (2005) 985-1015.
- [2] Y. Guo, K. Kannan, A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure, *Environ Sci Technol.* **24** (2013) 14442-14449.
- [3] C. Haman, X. Dauchy, C. Rosin, J-F. Muñoz, Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review, *Water Res.* **68** (2015) 1-11.
- [4] D. Bledzka, J. Gromadzinska, W. Wasowicz, Parabens. From environmental studies to human health, *Environ. Int.* **67** (2014) 27-42.
- [5] H-B. Lee, T. E. Peart, M. L. Svoboda, Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr A.* **1094** (2005) 122-129.
- [6] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, U. Hass, Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites, *Reprod. Toxicol.* **30** (2010) 301-312.
- [7] K. O. Kusk, T. Krüger, M. Long, C. Taxvig, A. E. Lykkesfeldt, H. Frederiksen *et al*, Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by in vivo and in vitro assays, *Environ. Toxicol. Chem.* **30** (2011) 413-426.
- [8] E. R. Neves, S. Schäfer, A. Phillips, J. Canejo, M. F. Macedo, Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration, *Int. Biodeter. Biodegr.* **63** (2009) 267-272.
- [9] C. Liao, K. Kannan, Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes, *Sci. Total. Environ.* **475** (2014) 8-15.
- [10] DEPA, Survey of Parabens – Part of the LOUS – review. Danish Environmental Protection Agency. **56** (2013).
- [11] N. Jonkers, H-P. Kohler, A. Dammshäuser, W. Giger, Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions, *Environ Pollut.* **157** (2009) 714-723.
- [12] N. Ramírez, F. Borrull, R. M. Marcé, Simultaneous determination of parabens and synthetic musks in water by stir-bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 580-588.
- [13] D. Bratkowska, R. M. Marcé, P. A. G. Cormack, F. Borrull, N. Fontanals, Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta.* **706** (2011) 135-142.
- [14] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, Analysis of Multiple Endocrine Disruptors in Environmental Waters via Wide-Spectrum Solid-Phase Extraction and Dual-Polarity Ionization LC-Ion Trap- MS/MS, *Anal. Chem.* **76** (2004) 704-711.



- [15] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M. H. Bollaín, R. Cela, Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level, *J. Chromatogr. A*. **1124** (2006) 3-10.
- [16] N. Jonkers, A. Sousa, S. Galanta-Oliveira, C. M. Barroso, H-P E. Kohler, W. Giger, Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **17** (2010) 834-843.
- [17] B. R. Ramaswamy, G. Shanmugam, G. Velu, B. Rengarajan, D. G. J. Larsson, GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers, *J. Hazard. Mater.* **186** (2011) 1586-1593.
- [18] X. Peng, Y. Yu, C. Tang, J. Tan, Q. Huang, Z. Wang, Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China, *Sci. Total. Environ.* **397** (2008) 158-166.
- [19] R. Serrano, T. Portolés, M. A. Blanes, F. Hernández, J. C. Navarro, I. Varó *et al.*, Characterization of the organic contamination pattern of a hyper-saline ecosystem by rapid screening using gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry *Sci. Total Environ.* **433** (2012) 161-168.
- [20] B. R. Ramaswamy, J-W. Kim, T. Isobe, K-H. Chang, A. Amano, T. W. Miller, *et al.* Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure, *J. Hazard. Mater.* **192** (2011) 1739-1745.
- [21] M. Terasaki, M. Makino, N. Tatarazako, Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays, *J. Appl. Toxicol.* **29** (2009) 242-247.
- [22] L.L. Dobbins, S. Usenko, R. A. Brain, B. W. Brooks, Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*, *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2744-2753.
- [23] M. Terasaki, R. Abe, M. Makino, N. Tatarazako, Chronic Toxicity of Parabens and Their Chlorinated By-Products in *Ceriodaphnia dubia*, *Environ. Toxicol.* **30** (2015) 664-673.
- [24] G. R. Medina, *El recurso de Artemia de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura*, Universitat de València, Valencia, 2012.
- [25] F. Amat, F. Hontoria, O. Ruiz, A. J. Green, M. I. Sánchez, J. Figuerola *et al.* The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean, *Biol. Invasions.* **7** (2005) 37-47.
- [26] K. Hund-Rinke and M. Simon, Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids, *Environ. Sci. Pollut. R.* **13** (2006) 225-232.
- [27] B. Nunes, F. Carvalho, L. Guilhermino, Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*, *Chemosphere* **62** (2006) 581-594.
- [28] G. Libralato, The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology, *Mar. Environ. Res.* **101** (2014) 38-43.
- [29] I. Varó, R. Serrano, E. Pitarch, F. Amat, F. J. López, J. C. Navarro, Bioaccumulation of Chlorpyrifos Through an Experimental Food Chain: Study of Protein HSP70 as Biomarker of Sublethal Stress in Fish, *Arch. Environ. Con. Tox.* **42** (2002) 229-235.
- [30] B. S. Nunes, F. D. Carvalho, L. M. Guilhermino, G. Van Stappen, Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing, *Environ. Pollut.* **144** (2006) 453-462.
- [31] I. Varó, J. C. Navarro, F. Amat, L. Guilhermino, Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*, *Chemosphere* **48** (2002) 563-569.
- [32] L. J. Buckley, RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea, *Mar. Biol.* **80** (1984) 291-298.
- [33] F. Melzner, J. W. Forsythe, P. G. Lee, J. B. Wood, U. Piatkowski, C. Clemmesen, Estimating recent growth in the cuttlefish *Sepia officinalis*: are nucleic acid-based indicators for growth and condition the method of choice? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **317** (2005) 37-51.
- [34] R. Tillner, T. Assheuer, B. Rennert, A. Trubiroha, C. Clemmesen, S. Wuertz, Evaluation of an improved RNA/DNA quantification method in a common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) larval feeding trial with *Artemia*, two nematodes (*Panagrellus redivivus* Linnaeus 1758), *Panagrolaimus* sp. Fuchs 1930) and dry feed, *J. Appl. Ichthyol.* **31** (2015) 466-473.
- [35] F. Amat, Utilización de *Artemia* en acuicultura. Informes Técnicos Investigación Pesquera, **128-129** (1985) 1-60.
- [36] R. Sarabia, *Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de Artemia*, Universitat de València, Valencia, 2002.
- [37] I. Varó, S. Redón, R. Garcia, E. M. Amat, F. Guinot, R. Serrano, *et al.* Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*, *Aquat. Toxicol.* **161** (2015) 208-220.



- [38] P. Vanhaecke, G. Persoone, 1984. *The ARC-test: a standardized short-term routine toxicity test with Artemia nauplii*, 2 (1984) 143-157, In: G. Persoone, E. Jaspers, C. Claus (eds.), Ecotoxicological testing for marine environment, Inst. Mar Scient Res Bredene, Belgium.
- [39] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, M. Freatherstone Robert, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88-90.
- [40] W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130-7139.
- [41] M. Solé, I. Varó, A. González-Mira, A. Torrealblanca, Xenobiotic metabolism modulation after long-term temperature acclimation in juveniles of *Solea senegalensis*, *Mar. Biol.* 162 (2015) 401-412.
- [42] I. Varó, J. C. Navarro, B. Nunes, L. Guilhermino, Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings, *Aquaculture* 266 (2007) 87-96.
- [43] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [44] Commission of the European Communities. *Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburgo, 1996.
- [45] H. Yamamoto, I. Tamura, Y. Hirata, J. Kato, K. Kagota, S. Katsuki *et al.* Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach, *Sci. Total Environ.* 410-411 (2011) 102-111.
- [46] C. Gambardella, T. Mesaric, T. Milivojevic, K. Sepcic, L. Gallus, S. Carbone *et al.* Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses, *Environ. Monit. Assess.* 186 (2014) 4249-4259.
- [47] B. Nunes, F. Carvalho, L. Guilhermino, Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*, *Ecotox. Environ. Safe.* 61 (2005) 414-419.
- [48] I. Varó, R. Serrano, J. C. Navarro, F. J. López, F. Amat, Acute lethal toxicity of the organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos to Different Species and Strains of *Artemia*, *Environ. Contam. Toxicol.* 61 (1998) 778-785.
- [49] S. Sukumaran and A. Gran, Multigenerational demographic responses of sexual and asexual *Artemia* to chronic genotoxicity by a reference mutagen, *Aquat. Toxicol.* 144-145 (2013) 66-74.
- [50] C. Gambardella, M. G. Aluigi, S. Ferrando, L. Gallus, P. Ramoino, A. M. Gatti *et al.* Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles, *Aquat. Toxicol.* 130-131 (2013) 77-85.
- [51] M. Solé, L. M. García de la Parra, S. Alejandre-Grimaldo, F. Sardá, Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea, *Mar. Pollut. Bull.* 52 (2006) 1708-1716.
- [52] V. M. Asnani y R. J. Verma, Ameliorative effects of ginger extract on paraben-induced lipid peroxidation in the liver of mice, *Drug Biochem.* 66 (2009) 225-228.
- [53] T. T. Vo, E-B. Jeung, An Evaluation of Estrogenic Activity of Parabens Using Uterine Calbindin-D9k Gene in an Immature Rat Model, *Toxicol. Sci.* 112 (2009) 68-77.
- [54] D-S. Popa, B. Kiss, L. Vlase, A. Pop, R. Iepure, R. Paltinean *et al.* Study of oxidative stress induction after exposure to bisphenol A and methylparaben in rats, 59 (2011) 539-549.
- [55] P. Goswami y J. C. Kalita, Endocrine disrupting effects of butylparaben: a review, *Inter. Res. J. Pharm.* 4 (2013) 1.
- [56] J. M. Brausch y G. M. Rand, A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity, *Chemosphere* 82 (2011) 1518-1532.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS-CSIC) la cesión de las instalaciones para su uso y el trato proporcionado, y a todas las personas que han hecho posible este proyecto.

