

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ciencias de la Vida**

Diseño de estudio del movimiento de microplásticos en la cadena trófica

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Biólogo**

**Presentado por:**

Génesis Cecibel Portilla Salazar

Angie Valeria Rendón Riofrío

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

## DEDICATORIA

Génesis Cecibel Portilla Salazar:

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por permitirme estar aún con vida y haber enviado personas que me han ayudado hacer lo correcto. A mi madre, quien fue la persona que me motivó a obtener un título profesional, la que siempre me acompañó en mis malas noches de estudio, me aconsejó y lloró conmigo cuando el estrés me invadía, que con sabias palabras supo tranquilizarme. Y a Angie Rendón quien más allá de estar conmigo desarrollando este proyecto, ha estado guiándome y explicándome lo necesario para llegar hasta aquí.

Angie Valeria Rendón Riofrío:

Dedico este proyecto a mi madre y a mi hermano, quienes me han amado, educado y apoyado en todo momento; que desde mi niñez batallaron mucho con cosas tan banales e insoportables como despertarme en las mañanas, pero que gracias a todo lo que siguen haciendo por mí, soy lo que soy. A todos los Riofrío que siempre han estado conmigo. Y a Génesis Portilla, mi gran amiga, con quien he disfrutado y aprendido tanto en esta etapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios en primer lugar por acompañarnos en este trayecto y nunca dejarnos solas. A nuestras madres quienes con mucho sacrificio nos han acompañado siempre, por sus consejos, regaños y paciencia. Dios nos ama tanto que nos dio la dicha de ser sus hijas, y esperamos enorgullecerlas siempre. A nuestros amigos de colegio, compañeros de nuestra y otras carreras, de los laboratorios en los que hemos estado, a ese grupo de amigas que estuvo con nosotras en los momentos más duros y felices de este trayecto de aprendizaje. A nuestro tutor, el Dr. Gustavo Domínguez, por ser uno de los mejores consejeros, del proyecto y de la vida, y por la paciencia y ayuda brindada a lo largo de este trabajo. Gracias a ESPOL por darnos una educación, profesores y amigos de calidad.

Y finalmente, gracias a nosotras mismas por creer en nuestro potencial, por todo el esfuerzo, la dedicación, y el no desfallecer, aunque las cosas no vayan del todo bien.

## DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Génesis Cecibel Portilla Salazar* y *Angie Valeria Rendón Riofrío* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



---

Génesis Cecibel Portilla  
Salazar



---

Angie Valeria Rendón  
Riofrío

# EVALUADORES

---

Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

---

Gustavo Adolfo Domínguez Cazco

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

La biomagnificación de microplásticos han sido ampliamente estudiados en ecosistemas marinos. Sin embargo, los estudios en ecosistemas de agua dulce son menos frecuentes. Muchos invertebrados, como dípteros y odonatas, inician su ciclo de vida en estos ecosistemas y están en constante exposición a microplásticos lo que facilita el transporte hacia organismos de otros niveles tróficos. Este estudio propone un protocolo para evaluar a los insectos como vectores de los microplásticos usando partículas fluorescentes para determinar el riesgo de biomagnificación y posibles efectos adversos en los organismos acuáticos. Este proyecto recolectó información sobre los efectos de los microplásticos de diferentes tamaños a varias concentraciones y tiempos de exposición en dípteros, odonatas, anuros y arácnidos. Para la determinación de la acumulación de microplásticos en los órganos internos se optó por la disección, extracción y digestión química. Mientras que la visualización de las partículas fluorescentes se realizó con microscopía de epifluorescencia para cuantificar el número de partículas por individuo. Los resultados mostraron que las partículas de mayor prevalencia fueron las de menor tamaño y el órgano con mayor acumulación fue el tracto gastrointestinal. Asimismo, el factor de biomagnificación fue mayor a 1 en todas las interacciones con excepción de los anuros. Este estudio demuestra que el empleo de partículas fluorescentes más la digestión química permite determinar la transferencia de microplásticos desde los mosquitos hacia otros organismos y que las partículas más pequeñas impactan mayormente en la biomagnificación de estas partículas en los órganos internos de los organismos acuáticos.

**Palabras clave:** microplástico, cadena trófica, transferencia ontogénica, biomagnificación

## **ABSTRACT**

*Microplastics biomagnification have been extensively studied in marine ecosystems. However, studies in freshwater ecosystems are less frequent. Many invertebrates, such as Diptera and Odonata, begin their life cycle in these ecosystems and are constantly exposed to microplastics and are constantly exposed to microplastics which facilitates MP transport to organisms at other trophic levels. This study proposes a protocol to evaluate insects as vectors of microplastics using fluorescent particles to determine the risk of biomagnification and possible adverse effects on aquatic organisms. This project collected information on the effects of microplastics of different sizes at various concentrations and exposure times on dipterans, odonates, anurans, and arachnids. To determine the accumulation of microplastics in the internal organs, dissection, extraction and chemical digestion were chosen. While visualization of fluorescent particles was performed with epifluorescence microscopy to quantify the number of particles per individual. The results showed that the most prevalent particles were the smallest and the organ with the highest accumulation was the gastrointestinal tract. Likewise, the biomagnification factor was greater than 1 in all interactions except for anurans. This study demonstrates that the use of fluorescent particles plus chemical digestion allows determining the transfer of microplastics from mosquitoes to other organisms and that the smallest particles have a greater impact on the biomagnification of these particles in the internal organs of aquatic organisms.*

**Keywords:** *microplastic, food chain, ontogenetic transfer, biomagnification*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción del problema .....	1
1.2. Justificación del problema .....	1
1.3. Objetivos.....	2
1.3.1. Objetivo General.....	2
1.3.2. Objetivos Específicos .....	2
1.4. Marco teórico .....	2
1.4.1. Insectos acuáticos.....	2
1.4.2. Microplásticos.....	4
1.4.3. Interacciones de los MP en ambientes acuáticos.....	6
1.4.4. Transferencia ontogénica .....	6
1.4.5. Biomagnificación .....	7
1.4.6. Impactos.....	8
2. METODOLOGÍA .....	9
2.1. Preparación de MP .....	9
2.2. Organismos de estudio.....	9
2.3. Diseño experimental .....	10
2.4. Cuantificación de MP en ensayos.....	12



2.5. Análisis estadístico .....	14
2.6. Factor de biomagnificación .....	14
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	16
3.1. Transferencia ontogénica .....	16
3.2. Transferencia trófica .....	17
3.2.1. Transferencia de MP desde Díptera hacia Odonata .....	17
3.2.2. Transferencia de MP de Odonata hacia Arácnida .....	18
3.2.3. Transferencia de MP desde Odonata a Anura .....	19
3.2.4. Análisis estadístico .....	20
3.2.5. Factor de biomagnificación.....	21
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	22
4.1. Conclusiones .....	22
4.2. Recomendaciones .....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	24
APÉNDICES.....	31

## ABREVIATURAS

MP	Microplásticos
PE	Polietileno
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PA	Poliamida
PET	Tereftalato de polietileno
PVC	Cloruro de polivinilo
MSFD	Marine Strategy Framework Directive
UV	Ultravioleta
<i>spp.</i>	Especies
HR	Humedad relativa
FBM	Factor de biomagnificación
TL	Nivel trófico, del inglés trophic level
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

## SIMBOLOGÍA

mm	Milímetro
µm	Micrómetro
rpm	Revoluciones por minuto
ml	Mililitro
°C	Grados Celsius
g	Gramo
µl	Microlitro
cm	Centímetro
kg	Kilogramo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCO <sub>2</sub> K	Formiato de potasio

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Modelo de cadena trófica planteada.....	10
Figura 2.3 Diseño experimental con diferentes concentraciones de MP .....	11
Figura 3.1 Porcentaje de supervivencia (A) y emergencia (B) de <i>Aedes aegypti</i> . .....	16
Figura 3.2. Porcentaje de MP encontrados en <i>E. vesiculosa</i> .....	17
Figura 3.3. Comparación de abundancia de MP en organismos de libélulas .....	17
Figura 3.4. Supervivencia de Odonata a diferentes concentraciones de MP .....	18
Figura 3.5. Comparación de efectos de MP en el peso de <i>P. pseudoannulata</i> .....	18
Figura 3.6. Número de partículas plásticas encontradas en el 4° estadio y adultez.....	19
Figura 3.7 Órganos de acumulación de MP en <i>R. temporaria</i> .....	19
Figura 3.8. Distribución del tamaño de MP en el tracto gastrointestinal de <i>Pelophylax</i> spp. .....	20
Figura 3.9. Relación entre el tamaño de los organismos y de MP ingeridos en ecosistemas de agua dulce .....	21

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación de desechos plásticos por tamaños .....	5
Tabla 3.1. Presencia de MP en forma de fragmentos encontrados en diferentes especies de herpetofauna en Paraguay .....	20

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Descripción del problema

La incorrecta disposición de plásticos causa la inevitable generación de pequeñas partículas plásticas, especialmente en ecosistemas acuáticos. El uso excesivo del plástico y la falta de educación ambiental en la ciudadanía conlleva a que este material sea depositado de forma incorrecta en los cuerpos de agua. Como consecuencia, el plástico bajo ciertas condiciones ambientales y procesos físicos se fragmenta en pequeñas partículas llamadas microplásticos (MP). Estas partículas diminutas pueden ser ingeridas por diferentes organismos de dichos hábitats. Se conoce que la principal vía de ingreso de los MP en las redes tróficas acuáticas es la ingestión directa por parte de peces, moluscos y aves, sin embargo, pueden existir otras rutas menos conocidas como la entrada de MP a través de la ingestión de insectos. El ingreso de los MP a las redes tróficas acuáticas por esta ruta podría implicar un mayor número de organismos contaminados y afectaría principalmente a la industria de alimentos como la pesca debido a una potencial bioacumulación de MP y biomagnificación en la red trófica, y como resultado habría una repercusión negativa en la producción alimentaria por no cumplir con estándares de calidad adecuados.

### 1.2. Justificación del problema

Debido a la versatilidad y múltiples propiedades del plástico, se ha logrado posicionar como el material de mayor empleabilidad en distintas industrias a nivel mundial. Hoy en día, el plástico es utilizado para fabricar y envolver muchos productos que consumimos, lo que lo convierte en el material preferido para diversos sectores productivos. Uno de los impactos directos en los organismos que componen los eslabones de la cadena trófica se da por la ingesta directa accidental de MP. Esto mayormente ocurre, cuando los organismos confunden a la partícula de plástico con su alimento. También, ocurre por la transferencia desde los consumidores primarios que han consumido MP, y que luego son ingeridos por los consumidores secundarios y terciarios. Como resultado, en las especies acuáticas,

la ingesta de MP podría acarrear problemas en la fecundidad, supervivencia larvaria y también puede comprometer el correcto desarrollo de los organismos. Pese a que en la actualidad se conoce las principales rutas de ingreso de los MP en las redes tróficas acuáticas, hay pocos estudios que demuestran cómo los MP se transfieren a través de los niveles tróficos. Asimismo, hay poca atención con lo que sucede en los niveles inferiores de la cadena trófica, especialmente en los consumidores primarios como los insectos. Por ello, la propuesta de este proyecto es exponer la importancia de conocer otras rutas de entrada de MP en la cadena trófica que son menos comunes y advertir cuáles podrían ser los MP con mayor potencial de biomagnificación desde los consumidores primarios como los insectos y así desarrollar estrategias de reducción del uso de determinados plásticos.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Evaluar el potencial de los insectos como vectores de ingreso de MP a las cadenas tróficas mediante el rastreo de partículas fluorescentes para la medición del riesgo de biomagnificación y los posibles efectos adversos en los organismos modelo.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

1. Seleccionar insectos con estadios larvarios acuáticos y sus principales predadores para el diseño de un modelo de cadena trófica.
2. Identificar los órganos con mayor acumulación de MP para la estimación de los efectos y los riesgos en la cadena trófica.
3. Analizar la ruta de entrada de los MP para la medición del factor de biomagnificación en la cadena trófica.
4. Proponer un modelo de estudio basado en el rastreo de MP para el conocimiento de su movimiento en cadenas tróficas compuestas por organismos pocos estudiados.

### **1.4. Marco teórico**

#### **1.4.1. Insectos acuáticos**

Los insectos son la clase de invertebrados que presentan el mayor número de individuos, diversidad de especies, morfología, comportamiento y fisiología en los distintos ecosistemas. Estos animales han llegado a colonizar casi todos los

compartimentos ambientales gracias a las diferentes maneras en las que se desplazan y solo una fracción de ellos presentan una serie de adaptaciones para poder nadar, cazar y desarrollarse sobre y bajo el agua (Bueno, 2005). El 3% de este gran grupo está constituido por insectos acuáticos, los cuales habitan en charcas, lagos, ríos, arroyos, zonas intermareales entre otros (Fontanarrosa et al., 2004). Se distinguen en dos grupos que en estadio larval o de ninfa cuentan con hábitos acuáticos y cuando son adultos culminan su ciclo de vida de forma terrestre, pero asociados a masas de agua como los órdenes Odonata, Ephemeroptera, Megaloptera, Trichoptera y Diptera. Además, los que permanecen todas sus fases en el agua gracias a estructuras respiratorias desarrolladas que permiten realizar el intercambio gaseoso y la osmorregulación (Castillo et al., 2018).

Los insectos del orden Odonata conocidos comúnmente como caballitos del diablo, libélulas o chapuletes, son organismos hemimetábolos, es decir que poseen tres etapas en su ciclo de vida: huevo, ninfas y adultos con coloraciones llamativas (Ramírez, 2010). Los adultos colocan sus huevos en la vegetación cercana a masas de agua dulce o en sustratos sumergidos, estos huevos eclosionan y pasan a un estado de ninfas o náyades que dura aproximadamente más de un año dependiendo de la especie, temperatura y disponibilidad de alimento. Luego, atraviesan una serie de transformaciones complejas, salen del agua y realizan su primer vuelo (Waringer & Humpesch, 1984). Son depredadores voraces e incluso caníbales, su alimentación se basa en invertebrados acuáticos, peces juveniles y microorganismos como protozoarios. De acuerdo a (Maneechan & Prommi, 2022a), existen especies capaces de almacenar micro fragmentos de polipropileno y tereftalato de polietileno en el tracto gastrointestinal; mientras que en las heces de algunas larvas se han evidenciado fibras maceradas producto de la transformación de mesoplástico (Immerschitt & Martens, 2021).

El orden Díptera incluye a moscas, mosquitos, tábanos y zancudos, caracterizados por la presencia de órganos pequeños en el metatórax denominados halterios, usados para el equilibrio y la dirección durante el vuelo (Gratelli, 2004). Son organismos holometábolos, es decir que pasan por una



metamorfosis completa: huevos, larvas que en la mayoría son acuáticas o viven en hábitats húmedos, pupas y el estadio adulto con un periodo relativamente corto y con función única de apareamiento y postura de huevos (Salazar & Moncada, 2004). Las larvas son herbívoras, carroñeras o descomponedores, es por ello que son propensas a ingerir MP que impactan en su organismo. Los adultos basan su alimentación en el néctar o secreciones de plantas, o incluso en la sangre de ciertos vertebrados (González & Sanhueza, 2004; Athor, 2009). La contaminación de sedimentos de agua dulce con microplástico de poliamida (PA) y polietileno tereftalato inducen un daño oxidativo, reducen la producción de energía aeróbica y la capacidad de desintoxicación en larvas de *Chironomus riparius* (Silva et al., 2021). Ambos grupos juegan un papel importante en la cadena trófica, tanto como consumidores o presas, siendo sus principales depredadores: murciélagos, ranas, lagartijas y arañas.

#### **1.4.2. Microplásticos**

Los plásticos más empleados en el mundo son el polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) tereftalato de polietileno (PET) y el poliestireno (PS) que representan el 69% del total de materiales plásticos a escala mundial y cuya materia prima es obtenida a partir de combustibles fósiles (United Nations, 2020). El consumo de plásticos se catapultó en los años 50, cuando su versatilidad, comodidad y bajo costo de producción los hizo atractivos para distintas industrias (Hale et al., 2020). Sin embargo, características como su durabilidad y persistencia los han convertido en contaminantes de preocupación emergentes (de Souza Machado et al., 2018), pues su disposición en tierra permite su traspaso a ecosistemas acuáticos. Este efecto se observa en mayor proporción en lugares donde existen asentamientos humanos cercanos a cuerpos de agua, en consecuencia, estos hábitats se transforman en sumideros y conductos de transporte de estos contaminantes plásticos a otras localidades.

La disponibilidad de estos plásticos a diferentes organismos se da tras su transformación a MP, definidos como partículas de diámetros entre 0.1 y 5000  $\mu\text{m}$ , clasificados por su tamaño en la tabla 1.1 según la European MSFD Working Group on Good Environmental Status (Wagner et al, 2014). También se clasifican

en dos tipos: primarios, los cuales son producidos intencionalmente, que incluyen: productos cosméticos, de limpieza, microfibras textiles, microfibras por desgaste de llantas, y son directamente liberados al ambiente en efluentes municipales (Ribeiro et al., 2019). Mientras que los MP secundarios son aparecen después de procesos de degradación o fragmentación por acción de la radiación UV, abrasión mecánica u oxidación atmosférica (García Viso, 2017).

**Tabla 1.1 Clasificación de desechos plásticos por tamaños**

<b>Tipos de plásticos</b>	<b>Tamaño</b>
Macroplásticos	> 25 mm
Mesoplásticos	5 – 25 mm
Microplásticos grandes	1 – 5 mm
Microplásticos pequeños	20 $\mu$ m – 1 mm
Nanoplásticos	< 20 $\mu$ m

La preocupación de la presencia de estos MP en ecosistemas acuáticos recae en que además de sus efectos propios en los diversos organismos, pueden funcionar como medio de transporte para los metales en ambientes acuáticos, tienen capacidad de absorber grandes concentraciones de contaminantes orgánicos y pueden permanecer suspendidos por largos periodos de tiempo, lo cual permite ampliar su distribución de manera fácil con los movimientos del agua (Chain (CONTAM), 2016).

El transporte y acumulación de MP en un ecosistema se ve afectado por su densidad, forma, tamaño. En cuanto a su densidad, la clasificación se da según el tipo de polímero. En los ecosistemas de agua dulce, los polímeros que dominan tanto los sedimentos como la columna de agua son: el polietileno (PE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS), mientras que existe una menor prevalencia de polyester, PA, PET, PVC, entre otros (Schwarz et al., 2019). En cuanto a formas, son las fibras, que incluyen textiles, filamentos e hilos de pescar, las que encabezan el tipo de MP con mayor presencia en ecosistemas acuáticos (Waite et al., 2018), seguido de fragmentos o partículas de formas irregulares, y el de menor contribución son la perlas de MP que incluyen cualquier plástico en forma de esferas (Walkinshaw et al., 2020).

### **1.4.3. Interacciones de los MP en ambientes acuáticos**

La presencia de MP en ecosistemas acuáticos obedece a la disposición de sus partículas de origen en zonas agrícolas, pesqueras, industrializadas y urbanizadas, donde las mismas actividades antropogénicas como: el uso de plásticos para protección de cultivos (Maraveas, 2020), construcción de barcos, uso de redes y cuerdas, (Lusher et al., 2017), tratamiento de aguas residuales y el empaquetado de productos, permiten la fragmentación de los plásticos y su transformación a MP, favoreciendo su acumulación en los ecosistemas acuáticos afectados.

Los MP encuentran su principal ruta de entrada a los ecosistemas acuáticos por actividades originadas en el ecosistema terrestre. En áreas industrializadas y urbanizadas, la pérdida accidental de productos plásticos, los procesos de lavandería, el uso de productos de cuidado personal y el quebrantamiento de productos plásticos para el hogar ocasionan la generación de MP (Mahon et al., 2017), que dado su tamaño y capacidad de flotabilidad, imposibilita la remoción completa por parte de las plantas de tratamiento y se favorece su traslado a ríos, lagos y océanos (Sarria Villa & Gallo-Corredor, 2016).

De acuerdo a Castañeta et al. (2020), la acción de los vientos permite que fragmentos de espuma y fibras sintéticas logren viajar largas distancias y depositarse en ambientes acuáticos. Algo similar ocurre con los desgastes de neumáticos y de carreteras, los cuales también pueden ser transportados por escorrentía hasta los cuerpos de agua, como consecuencia de fuertes lluvias (Yang et al., 2021). Lo que define a la atmósfera y las lluvias como otras rutas de ingreso de MP a ambientes acuáticos.

### **1.4.4. Transferencia ontogénica**

Los ambientes de agua dulce están habitados por organismos que pasan sus estadios juveniles en cuerpos de agua y etapas de adultos en el medio terrestre. Debido a las altas cantidades de MP en los sistemas acuáticos, es inevitable pensar que los organismos que habitan en dichos ecosistemas se encuentran

expuestos a estos contaminantes y son capaces de transferirlos al resto de la cadena. En la literatura, se encuentran diversos estudios que tratan sobre estas biomagnificaciones tróficas, sin embargo, son pocos los que exponen una posible transferencia ontogénica.

#### **1.4.5. Biomagnificación**

La presencia de MP en compartimentos acuáticos implican su disponibilidad para la ingesta directa o indirecta de diversos organismos, posibilitando su transferencia de un nivel trófico a otro y el aumento de sus concentraciones conforme van subiendo de nivel (McIlwraith et al., 2021). Para conocer el potencial que pueden tener los MP de bioacumularse y biomagnificarse en una cadena trófica es necesario conocer el tiempo de retención y la fracción consumida de cada organismo involucrado, así como su capacidad para mover el contaminante a través del epitelio intestinal u otros tejidos (Gómez Catalán et al., 2019).

En las cadenas tróficas acuáticas, se ha propuesto que la principal ruta de ingreso de MP corresponde a la ingesta directa por parte de organismos de niveles más bajos de los sistemas acuáticos como algas, fitoplancton y zooplancton (Lusher, 2015), mientras que para los organismos depredadores la ingesta indirecta está dada por las relaciones depredador-presa, la principal ruta de ingreso (Krause et al., 2021).

En ecosistemas marinos se ha documentado que microesferas de poliestireno consumidas por el bivalvo *Mytilus edulis* tienden a acumularse en diferentes tejidos de su principal depredador, el cangrejo *Carcinus maenas*. Los MP tienen la capacidad de trasladarse en el crustáceo mediante la hemolinfa, acumulándose en el tejido del estómago, branquias, hepatopáncreas y ovario (Miller et al., 2020). Esto demuestra su capacidad del biomagnificarse, aumentando la preocupación del efecto que puede tener en el depredador tope (Farrell & Nelson, 2013). Estudios han demostrado la transferencia ontogénica de MP en insectos (Al-Jaibachi et al., 2018) lo que les confiere la capacidad de transportarlos lejos de la zona de origen, sin embargo, el reconocimiento de estos organismos como

vectores de MP a las cadenas tróficas de otros ambientes ha sido poco estudiadas.

En ecosistemas de agua dulce, la ingesta de MP se ha reportado en insectos acuáticos como *Chironomus spp.*, *Siphonurus spp.*, *L. viridis* (Akindele et al., 2020) y en organismos con estadios larvarios acuáticos como *Aedes aegypti* (Simakova et al., 2022a), todos con alto potencial de ser consumidos por depredadores de su mismo ecosistema y lograr una transferencia a niveles tróficos más altos dentro de su cadena, o incluso permitir la circulación de estos MP a nuevos territorios.

#### **1.4.6. Impactos**

Los daños ambientales ocasionados por plásticos se pueden definir como efectos a nivel letal o subletal en la biodiversidad debido a efectos adversos causados principalmente por ingestión. Los efectos a nivel bioquímico o fisiológico son los más comunes reportados en organismos de la biota acuática y terrestre. La ingesta de altas concentraciones de MP conducen a un estrés oxidativo, reducción en la tasa de alimentación y del desempeño depredador, daño físico, alteraciones en las respuestas inmunes e histológicas locales, disminución en la actividad neurofuncional, desarrollo de patologías, entre otros.

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Preparación de MP

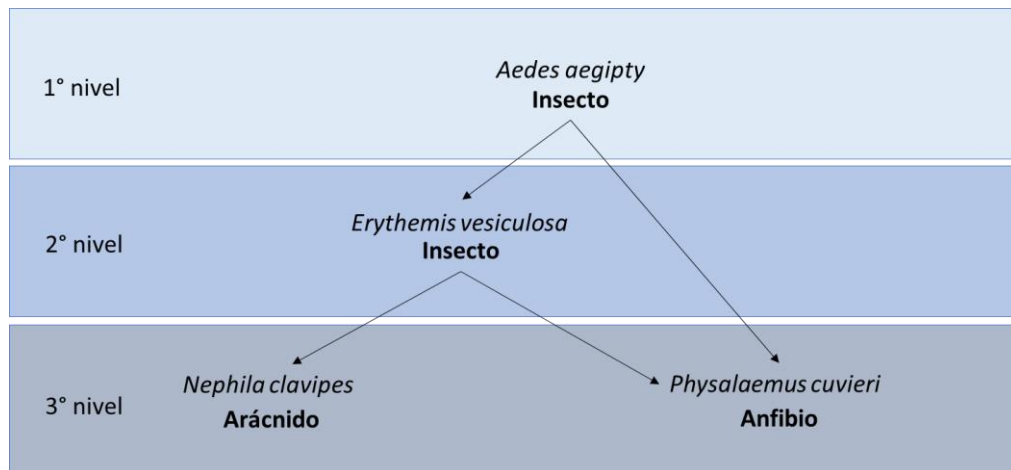
En este estudio se usó partículas de poliestireno modificado con carboxilato verde amarillo fluorescente de  $2 \pm 0.2 \mu\text{m}$  de diámetro y poliestireno verde dragón fluorescente de  $15.45 \pm 1.1 \mu\text{m}$  de diámetro. Las partículas de  $2 \pm 0.2 \mu\text{m}$  se almacenaron en una suspensión madre a una concentración de 2.5 mg/ml en agua destilada. Antes de preparar las diferentes concentraciones, esta concentración madre fue homogenizada. Mientras que todas las partículas de tamaño  $15.45 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , se almacenaron en forma de microesferas en una suspensión madre al 1% de soluto. Previo a la exposición de los organismos a los MP, los fragmentos fueron lavados mediante centrifugación a 9000 rpm por 10 minutos en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de solución madre. El sobrenadante se descartó y la fracción que quedó disponible fue centrifugada por una vez más, dicho proceso se lo realizó por dos veces consecutivas.

### 2.2. Organismos de estudio

La especie de mosquito *Aedes aegypti* fue seleccionada como organismo modelo para este estudio, ya que además de presentar una distribución global, desarrolla sus primeras etapas de vida en ambientes acuáticos y cuando son adultos se mudan a otro compartimento ambiental. Con esta especie se verificó la transferencia ontogénica de MP y los efectos de este contaminante en su desarrollo.

Primero, los organismos fueron ambientados a condiciones de laboratorio durante 15 días. Para llevar a cabo los experimentos se tomó una cohorte de mosquitos adultos libres de plástico con el fin de que se reproduzcan. Los mosquitos fueron alimentados con sucrosa y se les proporcionó un recipiente oscuro con agua de grifo para que depositen los huevos. Se recolectaron los primeros huevos después de 3 días y se los transfirió a una nueva celda donde permanecieron durante los 14 días que duró el estadio larvario, y luego se colectaron los mosquitos adultos que emergieron de las pupas.

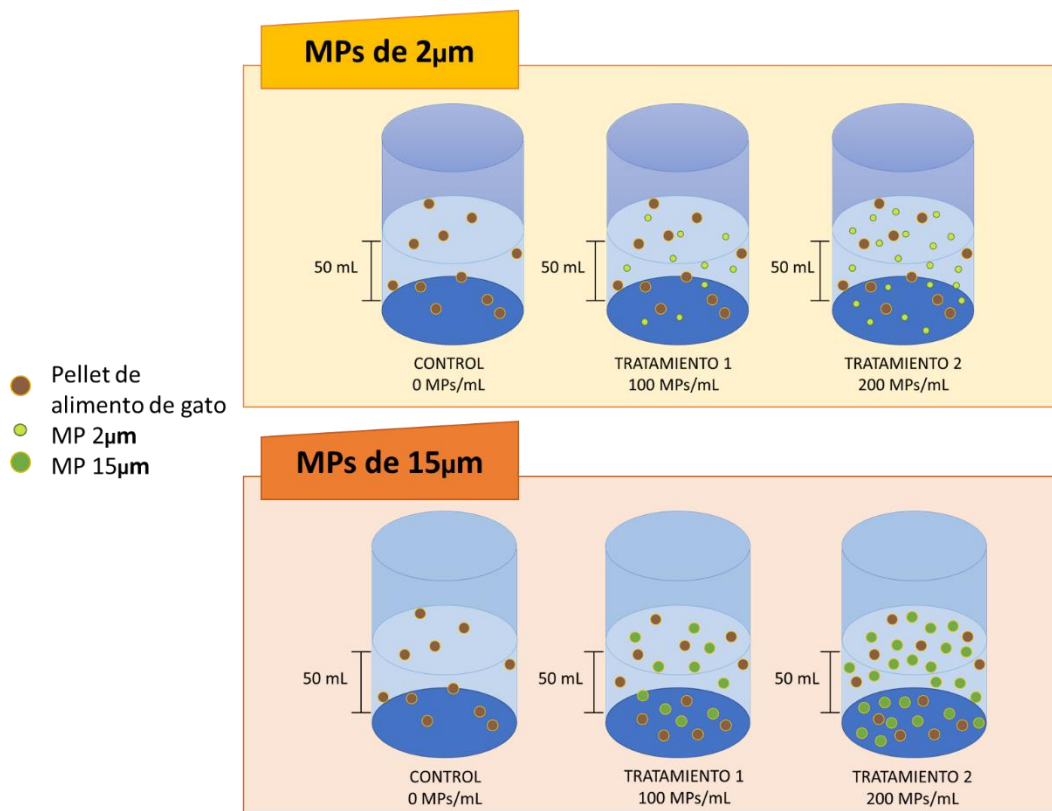
Para el modelamiento de la biomagnificación de MP en una cadena trófica que se desarrolla en ecosistemas acuáticos y terrestres se tomó como vector de ingreso de MP en el primer nivel a la especie *Aedes aegypti*. Mientras que el depredador del mosquito fue la libélula *Erythemis vesiculosa*, fue seleccionada debido a su amplia distribución y dieta basada en insectos de la orden díptera (Maneechan & Prommi, 2022b). Como depredador de tercer nivel trófico se seleccionó a la araña *Nephila clavipes* que consumió a *Aedes aegypti* que son los consumidores de microplásticos. Además, como un segundo depredador de 3 nivel se tomó al anfibio *Physalaemus cuvieri*, especie usada para determinar los efectos de los MP en los renacuajos (da Costa Araújo et al., 2020; Pastorino et al., 2022).



**Figura 2.1. Modelo de cadena trófica planteada**

### **2.3. Diseño experimental**

Para el ensayo de 14 días, se prepararon 3 tratamientos: control (0 MP/ml, tratamiento 1 (100 MP/ml) y tratamiento 2 (200 MP/ml) para cada tamaño de partícula a analizar como lo muestra la figura 2.2. Asimismo, en los 50 ml de agua de grifo usada para los tratamientos, se añadió 100 mg de pellets de comida de gato para evitar que la alimentación de los individuos expuestos sea sesgada por los MP.



**Figura 2.3 Diseño experimental con diferentes concentraciones de MP**

Se tomaron las nuevas larvas que surgieron de la última generación de mosquitos, y cuando estuvieron en su tercer estadio se sometieron a los tratamientos previamente preparados. Todos los tratamientos permanecieron en condiciones controladas de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclo de luz y oscuridad 16:8 y HR  $70 \pm 5\%$ . Se realizaron dos recolecciones durante todo el experimento, la primera fue en el estadio de pupas, y la segunda una vez que los organismos eclosionaron en adultos. Por cada beaker se tomó a 10 individuos, que fueron lavados 2 veces con agua destilada, depositados individualmente en tubos Eppendorf de 1.5 ml y almacenados a  $-20^\circ\text{C}$ . Los mosquitos adultos recolectados se pesaron con una microbalanza. Adicionalmente, se registró la tasa de mortalidad y la supervivencia de los organismos durante los 28 días de experimentación para cuantificar el número de mosquitos adultos que eclosionaron diariamente.

Para el modelamiento de la biomagnificación de MP en una cadena trófica, se unieron las poblaciones de mosquitos sobrevivientes del ensayo de transferencia ontogénica para formar un solo lote de individuos consumidores de MP, con excepción de los pertenecientes al control, los cuales fueron almacenados en un



recipiente distinto. Todos los organismos usados para esta experimentación se mantuvieron bajo condiciones controladas: temperatura de  $24 \pm 2$  °C y una alternación de luz y oscuridad de 12 horas. Para llevar a cabo este experimento, se diseñaron 3 ensayos tróficos que se describen a continuación.

En el primer ensayo, se tomó una población de 40 libélulas en estadio adulto previamente aclimatadas a las condiciones de laboratorio y se las separó en 4 grupos de 10 individuos, los cuales iban a corresponder a un grupo control, y 3 réplicas del ensayo. La dieta de las libélulas se basó en el consumo de mosquitos recolectados en la fase anterior y la adición de insectos que no habían sido parte de experimentos previos y que sean de corto tiempo de crianza como *Drosophila melanogaster*, para complementar su alimentación. Las libélulas del grupo de control fueron alimentadas con los mosquitos control del experimento previo mientras que las libélulas de las réplicas consumieron el lote de mosquitos consumidores de MP y adicionadas también un lote de *Drosophila melanogaster*. La duración de la exposición fue de 7 días, y se proporcionaban aproximadamente 28 mosquitos por día a cada grupo experimental.

En el segundo ensayo, se tomó a un grupo de 15 arañas divididas en 3 grupos de 5 individuos cada uno: un grupo control y 2 réplicas. Se alimentó las arañas con las libélulas consumidoras de mosquitos con MP y con los mosquitos consumidores de MP más la comida molida para gato. Este ensayo tuvo una duración de 5 días. Se verificó que al menos en promedio cada araña consume 2 libélulas diarias.

Para el tercer ensayo se seleccionó a un grupo de 8 ranas, divididas en 2 grupos: un grupo control con 4 individuos y un grupo tratamiento con 4 individuos. Las ranas fueron expuestas a una dieta que incluía a las libélulas consumidoras de mosquitos con MP, más los mosquitos consumidores de MP, más comida previamente molida para gato, durante 5 días.

#### **2.4. Cuantificación de MP en ensayos**

Después del primer ensayo de 14 días, se verificó la presencia de MP en *Aedes aegypti* para esto se realizó la homogenización de los ejemplares congelados en

500 µl de agua destilada durante 1 minuto. Posteriormente se filtraron a los individuos expuestos a los tratamientos con partículas de 2 µm y con partículas de tamaños combinados usando una membrana grabada con rastros de nucleoporos < 0.1 µm. Mientras que los individuos tratados con MP de 15 µm se filtraron mediante una membrana grabada con rastros de nucleoporos < 10 µm usando un soporte de filtro de vacío de vidrio conectado a una bomba de aire manual. Cada membrana fue analizada bajo el microscopio de epifluorescencia con aumento de 20x para comprobar la transferencia ontogénica y que los organismos hayan consumido MP. Así mismo se verificó la presencia de MP en los intestinos de mosquitos adultos luego de realizar su disección usando un estereoscopio binocular. De igual manera, para examinar la concentración de MP, se tomó 1 ml de la solución de cada beaker con una pipeta y se lo colocó en una caja Petri de 4.7 cm de diámetro que por debajo tenía una plantilla milimetrada que se utilizó para cuantificar las micropartículas usando un microscopio de epifluorescencia (objetivo: 20X). Este procedimiento se realizó para todos los tratamientos en los días 1 y 14 del experimento.

Por otro lado, para la cuantificación de MP en los organismos del ensayo biomagnificación, se realizó la digestión de los tractos gastrointestinales y del resto del cuerpo de los organismos. En total, para las libélulas, se realizaron 4 digestiones de los tractos gastrointestinales de 5 individuos, uno por cada réplica; y 4 digestiones con los cuerpos sin tracto gastrointestinal de 5 individuos por cada replica. Brevemente, para este proceso se usó 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y las muestras se almacenaron a temperatura ambiente por 7 días. Una vez que el tejido se había desintegrado, se añadieron 16 g de HCO<sub>2</sub>K (99%) a la solución y se agitó durante 4 horas para la separación de los tejidos blandos y líquidos disueltos. Posterior a esto se obtuvo una fase inorgánica, la cual fue descartada, y el sobrenadante. Este último se filtró utilizando filtros de membrana de nylon de 0.45 µm, el cual fue almacenado en placas de Petri cubiertas con papel aluminio, y colocadas en un gabinete de secado a 50°C durante 2 días.

La cuantificación de MP en arañas se basó en la identificación y conteo de partículas fluorescentes en distintos órganos. Para esto, se realizó la

homogeneización de los órganos extraídos mediante el uso de pistilos de vidrio, y se filtraron usando una membrana grabada con rastros de nucleoporos (Whatman, Reino Unido) de  $< 10 \mu\text{m}$  usando un soporte de filtro de vacío de vidrio conectado a una bomba de aire manual. Para la cuantificación de MP en el anuro estudiado, se optó por una digestión con 20 mg de la enzima Creon por cada gramo de tejido seleccionado. Los tejidos digeridos de un solo individuo: estómago, intestino y branquias; fueron filtrados en un filtro de  $6 \mu\text{m}$ , y luego almacenados en placas Petri a  $40^\circ\text{C}$  durante 2 días.

Finalmente, estos filtros fueron observados mediante un microscopio de fluorescencia con objetivo de 20x para la identificación y cuantificación de los 2 tipos de MP empleados. Este procedimiento se realizó tanto para *Nephila clavipes*, como para *Physalaemus cuvieri*.

## **2.5. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R Studio (Versión 3.4.2) (R Core Team, 2020). Para la exposición de 14 días se graficó la relación entre la concentración de MP y la tasa de mortalidad de mosquitos adultos, y también se identificó el tratamiento que más efecto tuvo en el peso corporal de los dípteros, además de determinar el tamaño de partícula que generó el mayor número de efectos en los organismos de estudio. En la biomagnificación trófica se evaluó las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos incluido el control, mediante ANOVA y la prueba de Tukey. También, se determinó la partícula responsable por el mayor número de efectos y cuáles fueron los órganos con mayor capacidad de bioacumulación. Se consideraron los datos significativamente diferentes siempre que  $p$  haya sido menor que 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## **2.6. Factor de biomagnificación**

El factor de biomagnificación permite determinar el potencial de cómo la contaminación de MP aumenta a medida que aumentan los niveles de la cadena trófica o, en su defecto, indica cómo este contaminante tiene la capacidad de elevar su concentración a medida que incrementan los niveles tróficos. Para el cálculo de este factor es necesario conocer: las concentraciones de MP en el depredador y la

presa en unidades de g por kg del organismo. Además, se necesita conocer los niveles tróficos de estos organismos y se utilizan las siguiente fórmula:

$$FBM_{TL} = \frac{C_{depredador}/C_{presa}}{TL_{depredador} - TL_{presa}} \quad (2.1)$$

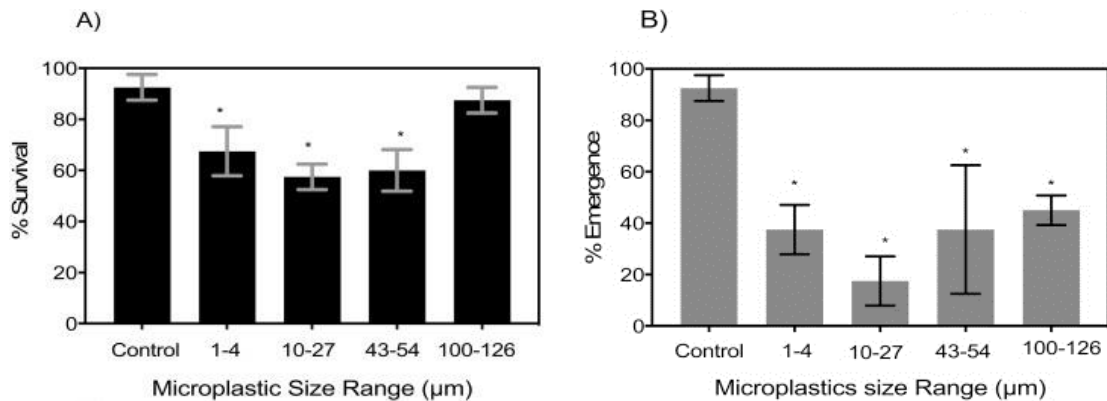
- $C_{depredador}$  y  $C_{presa}$ : concentraciones de MP en el depredador y la presa.
- $TL_{depredador}$  y  $TL_{presa}$ : Niveles tróficos del depredador y presa.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1. Transferencia ontogénica

Se espera que el grupo control de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* no presente partículas de MP fluorescentes. En grupos expuestos a distintas concentraciones de partículas se observó que es en la etapa larvaria, donde existió una mayor acumulación y concentración de MP dentro del organismo. Estas partículas fueron capaces de mantenerse durante las etapas de pupas y adultos y presentaron una menor concentración en el estadio final. Se observó que los túbulos de Malpighi son los órganos donde hubo mayor acumulación, y que las partículas fluorescentes de menor diámetro (2 µm) fueron las que se encontraban en mayor abundancia al compararlas con los tratamientos en los que solo hubo exposición a partículas de mayor tamaño (15 µm) (Al-Jaibachi et al., 2018). En experimentaciones realizadas por Simakova et al. (2022), se determinó que un mosquito en estadio larvario es capaz de consumir  $7.3 \times 10^6$  partículas de MP tras 3 días de exposición, al pasar por pupas, prevalecieron 15.8 MP, y en la etapa de adultos en promedio permanecieron 10.9 partículas de MP (Simakova et al., 2022b).



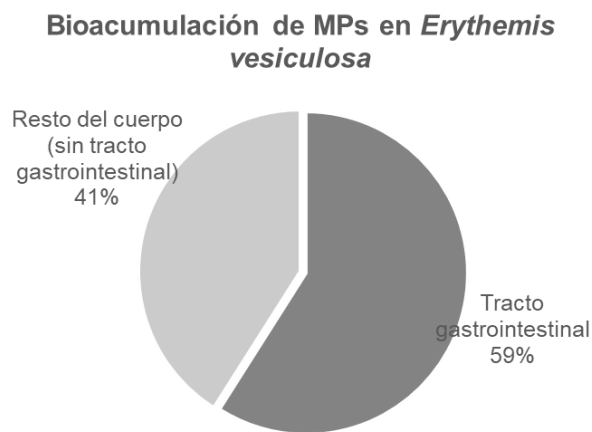
**Figura 3.1** Porcentaje de supervivencia (A) y emergencia (B) de *Aedes aegypti*.

Sobre la supervivencia, se reportó que el díptero Culicidae presentó un 70% al estar expuestos a partículas de 1 – 4 µm, y un 57% en presencia de MP de 10 – 27 µm, y un porcentaje de emergencia notablemente menor en tratamientos con partículas de 10 – 27 µm en comparación con el tratamiento de 1 – 4 µm (Ziajahromi et al., 2018) como se observa en la figura 3.1.

### 3.2. Transferencia trófica

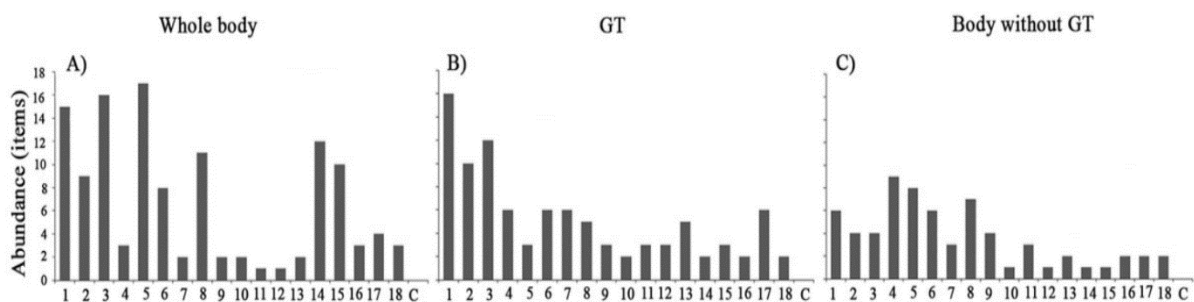
#### 3.2.1. Transferencia de MP desde Díptera hacia Odonata

Los individuos de *Erythemis vesiculosa* analizados en el estudio de Maneechan & Prommi (2022) presentaron el más alto porcentaje de MP en el tracto gastrointestinal, correspondiendo al 59% (95 partículas de MP), el 41% restante de partículas plásticas (66 partículas) fueron localizadas en el cuerpo sin incluir el tracto gastrointestinal (figura 3.2).



**Figura 3.2. Porcentaje de MP encontrados en *E. vesiculosa***

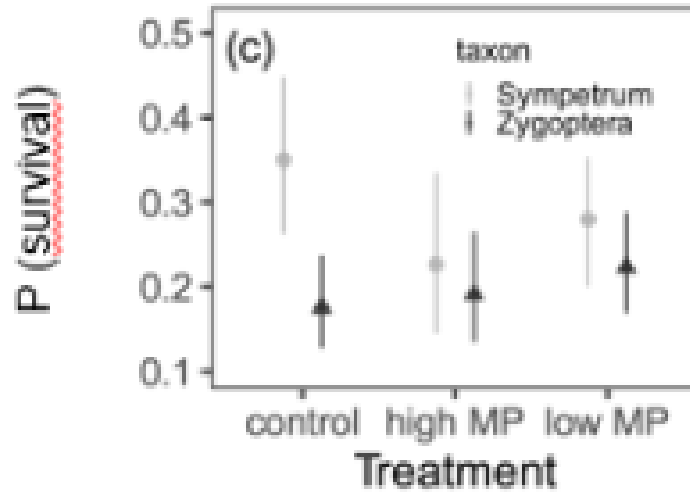
La figura 3.3 muestra que en cada sección analizada se realizaron 18 réplicas, de las cuales la abundancia media fue de  $1.06 \pm 0.77$  de MP en el tracto gastrointestinal y  $0.73 \pm 0.51$  de MP en el resto del cuerpo.



**Figura 3.3. Comparación de abundancia de MP en organismos de libélulas**

La supervivencia de diferentes géneros de odonatas (Sympetrum y Zygoptera), Yildiz et al. (2022) se muestra en la figura 3.4. La probabilidad de supervivencia

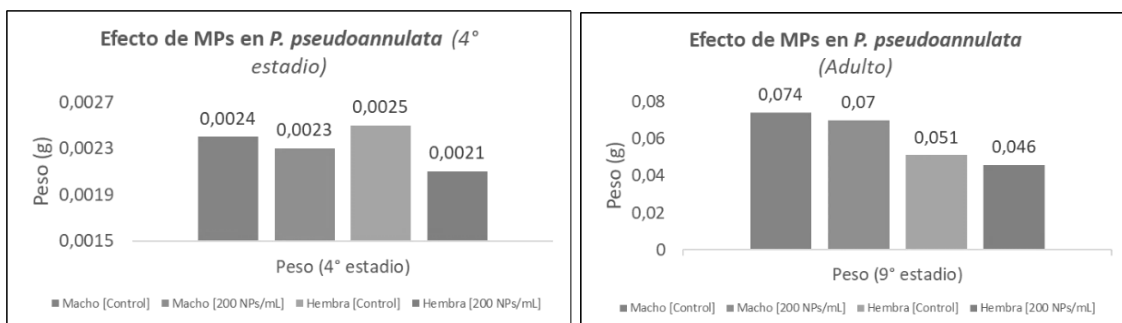
de estos organismos en presencia de altas concentraciones de MP fue de 22.5% mientras que para bajas concentraciones fue del 27.7% .



**Figura 3.4. Supervivencia de Odonata a diferentes concentraciones de MP**

### 3.2.2. Transferencia de MP de Odonata hacia Arácnida

Los ensayos demuestran que la acumulación de MP se dió mayormente en el intestino bajo, además de la existencia de deformacion epiteliales en esta área. Como efecto en el desarrollo, en la figura 3.5 se demuestra que el peso de los machos y hembras del grupo control en su cuarto estadio fue mayor en un 0.1% y 0.4% respectivamente, en comparación con el grupo de organismos expuestos a 200 partículas por cada  $\mu$ l. El tiempo para alcanzar su desarrollo completo fue mayor en los organismos expuestos a estas partículas (Cui et al., 2022).



**Figura 3.5. Comparación de efectos de MP en el peso de *P. pseudoannulata***

En la figura 3.6, se observa que durante su cuarto estadio los organismos arácnidos almacenaron 120 MP de 0.2  $\mu$ m y 200 partículas de 0.1  $\mu$ m, mientras

que, en el estado de adultez las partículas en el intestino aumentaron, las de 0.2  $\mu\text{m}$  a 200 y las de 0.1  $\mu\text{m}$  a 500 partículas plásticas.

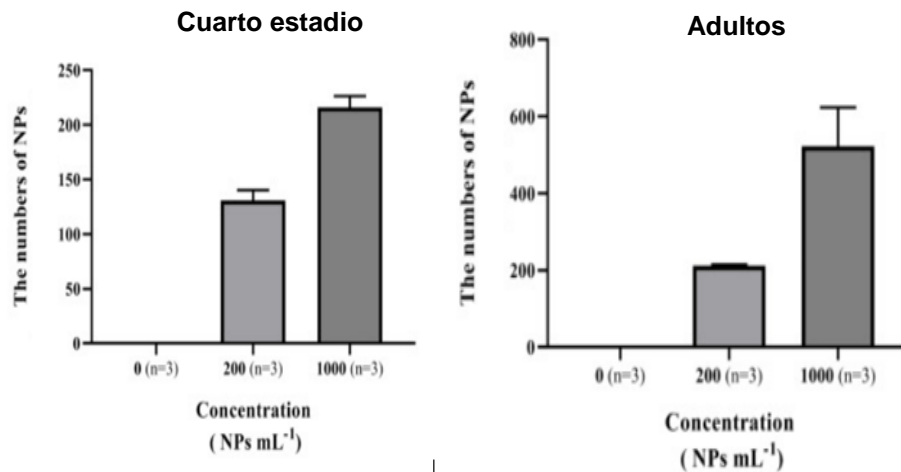


Figura 3.6. Número de partículas plásticas encontradas en el 4° estadio y adultez

### 3.2.3. Transferencia de MP desde Odonata a Anura

En estudios paralelos al anfibio *Rana temporaria*, se encontró que la acumulación de MP se da en el siguiente orden, de mayor a menor concentración (figura 3.7): intestinos, branquias, hígado, y tejidos musculares de a cola. En el análisis visual, se encontró que los MP presentaban un menor diámetro y una forma más circular (da Costa Araújo et al., 2020).



Figura 3.7 Órganos de acumulación de MP en *R. temporaria*

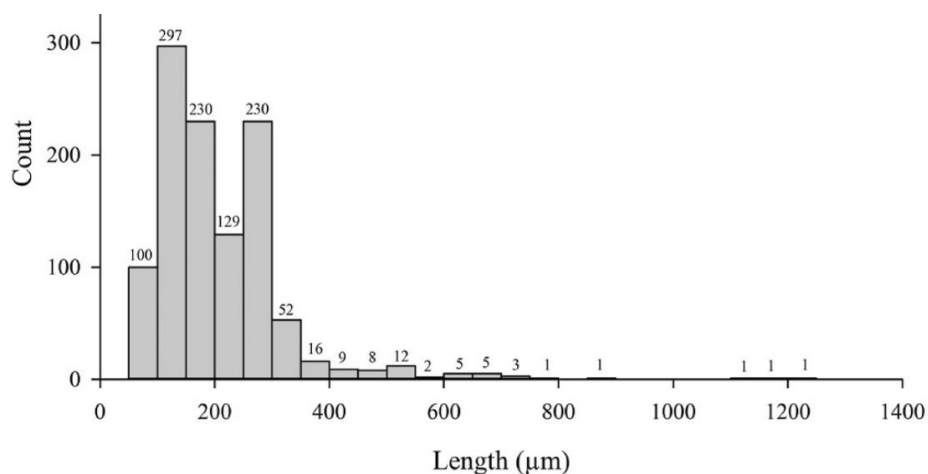


Por otro lado, Mackezie & Vladimirova (2021) encontró que el estómago de diferentes especies de herpetofauna almacenaban, en promedio, 6.7 fragmentos de plásticos al estar expuestos en ambientes acuáticos en la naturaleza (tabla 3.1), lo cual se obtuvo tras analizar muestras de lavados estomacales y el uso de equipos de FT-IR.

**Tabla 3.1. Presencia de MP en forma de fragmentos encontrados en diferentes especies de herpetofauna en Paraguay**

Especie	Promedio de MP encontrados
Rhinella diptycha (adulto)	3.96
Rhinella diptycha (juvenil)	2.99
Hemidactylus mabouia (adulto)	13.00

Mientras que Tatli et al. (2022) encontró que *Pelophylax spp.* presenta en promedio 4.62 fragmentos de MP en el tracto gastro intestinal de individuos, siendo los de mayor prevalencia los de 100 – 150  $\mu\text{m}$  como se observa en la figura 3.8.

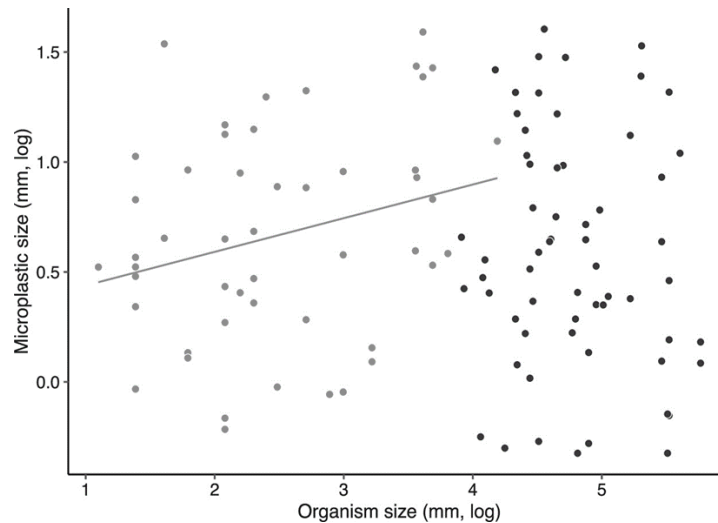


**Figura 3.8. Distribución del tamaño de MP en el tracto gastrointestinal de *Pelophylax spp.***

### 3.2.4. Análisis estadístico

García et al. (2021) demostró que existe una correlación positiva entre el tamaño de las partículas y el tamaño de los organismos, especialmente en macroinvertebrados. Es así que en organismos como *Nephira clavipes*, donde los machos poseen tamaños de 8 mm, podrían tener la capacidad de ingerir partículas de hasta 2 mm. En la figura 3.9, se observa la relación entre el tamaño de los

organismos y el tamaño de MP. Los puntos grises representan a los macroinvertebrados y los puntos negros a los peces.



**Figura 3.9. Relación entre el tamaño de los organismos y de MP ingeridos en ecosistemas de agua dulce**

### 3.2.5. Factor de biomagnificación

Se espera que el factor de biomagnificación sea mayor a 1 en todas las relaciones tróficas con excepción de la orden anura, debido a que los estudios previos realizados con partículas de mayor tamaño revelan que a mayor tamaño de los MP existe un menor número de partículas en los órganos analizados en anuros. Pero, se espera que a menor tamaño de MP, la concentración aumente en distintos órganos, especialmente los del sistema gastrointestinal. Estos valores en el factor de biomagnificación podrían indicar que ocurre una magnificación en lugar de la dilución de estos contaminantes en la cadena trófica.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

A partir de la metodología desarrollada se puede incluir una variedad de organismos que presenten estadios acuáticos, presenten el potencial de consumir MP y además transfieran fácilmente estas partículas a nuevos espacios dentro de los ambientes acuáticos. Los procesos digestivos son los más afectados en el proceso de biomagnificación debido a que se encontraron MP en el tracto gastrointestinal. Además, parece existir una correlación negativa entre el tamaño de los organismos y el tamaño de las partículas. A pesar de esto, no todos los individuos de una cadena trófica presentarán cambios significativos en el aspecto de peso y supervivencia. En el caso de los organismos del orden Díptera, no hubo impacto negativo significativo en la supervivencia y emergencia después de los bioensayos, mientras que lo contrario ocurre en el orden Odonata donde hay un valor de emergencia menor en organismos expuestos a altas concentraciones.

Por otro lado, fue muy útil el empleo de partículas fluorescentes en combinación con el uso de microscopia fluorescente que permitió que la observación y cuantificación de MP sea más fácil. Asimismo, el protocolo de digestión diferenciado para cada organismo permite estudiar un mayor número de órganos debido a que el empleo de sustancias como NaOH y HCO<sub>2</sub>K y distintas membranas permite la recuperación de las partículas plásticas ingeridas o transferidas a diferentes órganos. Y solo sería necesario cambiar los volúmenes de reactivos necesarios acorde al peso de lo que se desee digerir por los métodos químicos antes mencionados. El protocolo de digestión de los distintos organismos puede fácilmente adaptarse a otros sistemas e identificarse nuevos sitios de almacenamiento.

### 4.2. Recomendaciones

Como futuras líneas de investigación se recomienda el estudio de nuevos insectos como vectores de ingreso de MP a nuevos ecosistemas. Actualmente el mayor enfoque está dirigido a los dípteros y efemerópteras, sin embargo, organismos del

orden Odonata, también presentan estadios larvarios, así como algunos anfibios, por lo que su estudio es ampliamente recomendado.

Debido a la biomagnificación y capacidad de adsorción de los MP con contaminantes inorgánicos como metales, se recomienda estudiar las sustancias que son más propensas a generar esta interacción y mostrar cuales son los efectos en organismos de ecosistemas acuáticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akindele, E. O., Ehlers, S. M., & Koop, J. H. E. (2020). Freshwater insects of different feeding guilds ingest microplastics in two Gulf of Guinea tributaries in Nigeria. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(26), 33373-33379. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08763-8>
- Al-Jaibachi, R., Cuthbert, R. N., & Callaghan, A. (2018). Up and away: Ontogenic transference as a pathway for aerial dispersal of microplastics. *Biology Letters*, 14(9), 20180479. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0479>
- Athor, J. (2009). *Parque Costero del Sur: Magdalena y Punta Indio, provincia de Buenos Aires : naturaleza, conservación y patrimonio cultural*. José.
- Bueno, J. (2005). *Biodiversidad del Estado de Tabasco*. UNAM.
- Castillo, M. M., Barba-Álvarez, R., Mayorga, A., Castillo, M. M., Barba-Álvarez, R., & Mayorga, A. (2018). Riqueza y diversidad de insectos acuáticos en la cuenca del río Usumacinta en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89, 45-64. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.4.2177>
- Chain (CONTAM), E. P. on C. in the F. (2016). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*, 14(6), e04501. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>
- Cui, Y., Wang, Z., Zhang, G., Zhao, Y., Peng, Y., & Yun, Y. (2022). Transmission of nanoplastics from *Culex quinquefasciatus* to *Pardosa pseudoannulata* and its impact on predators. *Science of The Total Environment*, 820, 153331. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153331>
- da Costa Araújo, A. P., de Melo, N. F. S., de Oliveira Junior, A. G., Rodrigues, F. P., Fernandes, T., de Andrade Vieira, J. E., Rocha, T. L., & Malafaia, G. (2020). How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine

- polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *Journal of Hazardous Materials*, 382, 121066. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121066>
- de Souza Machado, A. A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., & Rillig, M. C. (2018). Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global Change Biology*, 24(4), 1405-1416. <https://doi.org/10.1111/gcb.14020>
- Farrell, P., & Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.046>
- Fontanarrosa, M. S., Torres, P. L. M., & Michat, M. C. (2004). Comunidades de insectos acuáticos de charcos temporarios y lagunas en la ciudad de Buenos Aires (Argentina). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 63(3-4), 55-65.
- Garcia, F., de Carvalho, A. R., Riem-Galliano, L., Tudesque, L., Albignac, M., ter Halle, A., & Cucherousset, J. (2021). Stable Isotope Insights into Microplastic Contamination within Freshwater Food Webs. *Environmental Science & Technology*, 55(2), 1024-1035. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06221>
- García Viso, J. (2017). *Estudio de la contaminación por microplásticos mediante análisis de imagen* [Universidad de Las Palmas de Gran Canaria]. [https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/95225/1/0747316\\_00000\\_0000.pdf](https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/95225/1/0747316_00000_0000.pdf)
- Gómez Catalán, J., Timoner Alonso, I., Castell Garralda, V., Salas-Salvadó, J., Sanchís Almenar, V., & Nadal Lomas, M. (2019). *Microplásticos y nanoplásticos en la cadena alimentaria. Situación actual*. 33.
- González, C., & Sanhueza, Y. (2004). ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ARMADURA BUCAL DE HEMBRAS EN 3 ESPECIES DE SCAPTIA (SCAPTIA) WALKER DE DISTRIBUCIÓN CHILENA (DIPTERA: TABANIDAE) COMPARATIVE STUDY OF MOUTHPARTS OF THE FEMALE OF THREE SPECIES OF SCAPTIA

- (SCAPTIA) WALKER FROM CHILE (DIPTERA: TABANIDAE). *Acta Entomologica Chilena*, 28, 23-31.
- Gratelli, P. R. (2004). Enfermedades infecciosas endémicas en el Perú transmitidas por dípteros hematófagos. *Ciencia e Investigación*, 7(2), 54-57. <https://doi.org/10.15381/ci.v7i2.3360>
- Hale, R. C., Seeley, M. E., La Guardia, M. J., Mai, L., & Zeng, E. Y. (2020). A Global Perspective on Microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 125(1), e2018JC014719. <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>
- Immerschitt, I., & Martens, A. (2021). Ejection, ingestion and fragmentation of mesoplastic fibres to microplastics by *Anax imperator* larvae (Odonata: Aeshnidae). *Odonatologica*, 49(1-2), 57-66. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3823329>
- Krause, S., Baranov, V., Nel, H. A., Drummond, J. D., Kukkola, A., Hoellein, T., Sambrook Smith, G. H., Lewandowski, J., Bonet, B., Packman, A. I., Sadler, J., Inshyna, V., Allen, S., Allen, D., Simon, L., Mermillod-Blondin, F., & Lynch, I. (2021). Gathering at the top? Environmental controls of microplastic uptake and biomagnification in freshwater food webs. *Environmental Pollution*, 268, 115750. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115750>
- Lusher, A. (2015). Microplastics in the Marine Environment: Distribution, Interactions and Effects. En M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 245-307). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_10)
- Lusher, A., Hollman, P. C. H., & Mendoza-Hill, J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture: Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Mackenzie, C. M., & Vladimirova, V. (2021). Preliminary study and first evidence of presence of microplastics in terrestrial herpetofauna from Southwestern Paraguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 0(0), 1-9. <https://doi.org/10.1080/01650521.2021.1895466>
- Mahon, A. M., O'Connell, B., Healy, M. G., O'Connor, I., Officer, R., Nash, R., & Morrison, L. (2017). Microplastics in Sewage Sludge: Effects of Treatment. *Environmental Science & Technology*, 51(2), 810-818. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04048>
- Maneechan, W., & Prommi, T. O. (2022a). Occurrence of microplastics in edible aquatic insect *Pantala* sp. (Odonata: Libellulidae) from rice fields. *PeerJ*, 10, e12902. <https://doi.org/10.7717/peerj.12902>
- Maneechan, W., & Prommi, T. O. (2022b). Occurrence of microplastics in edible aquatic insect *Pantala* sp. (Odonata: Libellulidae) from rice fields. *PeerJ*, 10, e12902. <https://doi.org/10.7717/peerj.12902>
- Maraveas, C. (2020). Environmental Sustainability of Plastic in Agriculture. *Agriculture*, 10(8), 310. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080310>
- McIlwraith, H. K., Kim, J., Helm, P., Bhavsar, S. P., Metzger, J. S., & Rochman, C. M. (2021). Evidence of Microplastic Translocation in Wild-Caught Fish and Implications for Microplastic Accumulation Dynamics in Food Webs. *Environmental Science & Technology*, 55(18), 12372-12382. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02922>
- Miller, M. E., Hamann, M., & Kroon, F. J. (2020). Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: A review and meta-analysis of current data. *PLOS ONE*, 15(10), e0240792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240792>
- Pastorino, P., Prearo, M., Di Blasio, A., Barcelò, D., Anselmi, S., Colussi, S., Alberti, S., Tedde, G., Dondo, A., Ottino, M., Pizzul, E., & Renzi, M. (2022). Microplastics



- Occurrence in the European Common Frog (*Rana temporaria*) from Cottian Alps (Northwest Italy). *Diversity*, 14(2), 66. <https://doi.org/10.3390/d14020066>
- Ramírez, A. (2010). Capítulo 5: Odonata. *Revista de Biología Tropical*, 58, 97-136.
- Ribeiro, F., O'Brien, J. W., Galloway, T., & Thomas, K. V. (2019). Accumulation and fate of nano- and micro-plastics and associated contaminants in organisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.010>
- Salazar, M. J., & Moncada, L. I. (2004). Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomédica*, 24(4), 385-392.
- Sarria Villa, R. A., & Gallo-Corredor, A. (2016). *La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos*.
- Schwarz, A. E., Ligthart, T. N., Boukris, E., & van Harmelen, T. (2019). Sources, transport, and accumulation of different types of plastic litter in aquatic environments: A review study. *Marine Pollution Bulletin*, 143, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.029>
- Silva, C. J. M., Patrício Silva, A. L., Campos, D., Machado, A. L., Pestana, J. L. T., & Gravato, C. (2021). Oxidative damage and decreased aerobic energy production due to ingestion of polyethylene microplastics by *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123775. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123775>
- Simakova, A., Varenitsina, A., Babkina, I., Andreeva, Y., Bagirov, R., Yartsev, V., & Frank, Y. (2022a). Ontogenetic Transfer of Microplastics in Bloodsucking Mosquitoes *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Is a Potential Pathway for Particle

- Distribution in the Environment. *Water*, 14(12), 1852.  
<https://doi.org/10.3390/w14121852>
- Simakova, A., Varenitsina, A., Babkina, I., Andreeva, Y., Bagirov, R., Yartsev, V., & Frank, Y. (2022b). Ontogenetic Transfer of Microplastics in Bloodsucking Mosquitoes *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Is a Potential Pathway for Particle Distribution in the Environment. *Water*, 14(12), 1852.  
<https://doi.org/10.3390/w14121852>
- Tatlı, H. H., Altunışık, A., & Gedik, K. (2022). Microplastic prevalence in anatolian water frogs (*Pelophylax* spp.). *Journal of Environmental Management*, 321, 116029.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116029>
- Waite, H. R., Donnelly, M. J., & Walters, L. J. (2018). Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 129(1), 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.026>
- Walkinshaw, C., Lindeque, P. K., Thompson, R., Tolhurst, T., & Cole, M. (2020). Microplastics and seafood: Lower trophic organisms at highest risk of contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110066.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110066>
- Waringer, J. A., & Humpesch, U. H. (1984). Embryonic development, larval growth and life cycle of *Coenagrion puella* (Odonata: Zygoptera) from an Austrian pond. *Freshwater Biology*, 14(4), 385-399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1984.tb00162.x>
- Yang, L., Zhang, Y., Kang, S., Wang, Z., & Wu, C. (2021). Microplastics in freshwater sediment: A review on methods, occurrence, and sources. *Science of The Total Environment*, 754, 141948. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141948>

Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P. A., & Leusch, F. D. L. (2018). Environmentally relevant concentrations of polyethylene microplastics negatively impact the survival, growth and emergence of sediment-dwelling invertebrates. *Environmental Pollution*, 236, 425-431. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.094>

# APÉNDICES

## APÉNDICE A

### Preparación de microplásticos

1. Preparación de suspensión madre, con partículas de poliestireno modificado con carboxilato verde amarillo fluorescente de  $2 \pm 0.2 \mu\text{m}$  y poliestireno verde dragón fluorescente de  $15.45 \pm 1.1 \mu\text{m}$ .
2. Suspender las partículas de  $2 \pm 0.2 \mu\text{m}$  en agua destilada para obtener una concentración de 2.5 mg/ml, y homogenizarlas previo a la preparación de las diferentes concentraciones.
3. Suspender las partículas de tamaño  $15.45 \pm 1.1 \mu\text{m}$  en forma de microesferas para obtener una concentración con 1% de soluto.
4. Realizar los cálculos para las diluciones de las soluciones madres de cada tamaño de partícula, y obtener alícuotas con concentraciones de 100 y 200 MP/ml en un volumen de 50 ml por réplica. El volumen final dependerá de la cantidad de réplicas que se desean realizar, pero siempre es recomendable realizar al menos por triplicado.
5. Homogeneizar la solución madre y colocar el volumen necesario en tubos Eppendorf de 1.5 ml en alícuotas de 1 ml.
6. Realizar un lavado de las soluciones mediante la centrifugación de las alícuotas a 9000 rpm por 10 minutos, descartar el sobrenadante y repetir el proceso 2 veces más. Finalmente, resuspender en 1ml de agua destilada.
7. Preparar las diluciones para los tratamientos: 0 MP/ml para el grupo "Control", 100 MP/ml para el "Tratamiento 1" y 200 MP/ml para el "Tratamiento 2".
8. Para comprobar la concentración de MP en los tratamientos, se tomó 1 ml de la solución de cada beaker y se lo colocó en una caja Petri de 4.7 cm que constaba de una plantilla milimetrada.
9. Para cuantificar las micropartículas, colocar la caja Petri en un microscopio de epifluorescencia (objetivo: 20X) para realizar una inspección visual.
10. Colocar 50 ml de la solución preparada por cada tratamiento en vasos de precipitación, y también añadir 100 mg de pellets de comida de gato para complementar la dieta.

## APÉNDICE B

### Transferencia Ontogénica

1. Realizar el acondicionamiento de los dípteros *Aedes aegypti* a condiciones de laboratorio, durante 15 días.
2. Tomar una cohorte de mosquitos adultos para que se reproduzcan. Colocarlos dentro de una celda con sucrosa y un recipiente oscuro con agua de grifo para colectar los huevos.
3. Recolectar los primeros huevos después de 3 días y se los transfirió a una nueva celda durante los 14 días que duró el estadio larvario, y colectar los mosquitos adultos que emerjan de las pupas.
4. Transferir los individuos de *Aedes aegypti* a los beakers con los tratamientos y cubrirlos con una malla oscura para que depositen los huevos en este lugar.
5. A los 14 días tomar 10 individuos en estado de pupas por cada beaker, registrar su peso, lavar con agua destilada, colocarlos en tubos Eppendorf y almacenarlos a 20°C.
6. A los 28 días realizar la cuantificación de los organismos y registrar la tasa de emergencia y mortalidad.
7. Tomar 10 individuos de la nueva cohorte de mosquitos adultos por cada beaker y registrar su peso. Realizar su lavado con agua destilada.
8. Colocarlos en tubos Eppendorf y almacenarlos a 20°C.
9. Para la verificación de MP, realizar la homogenización de los ejemplares congelados en 500 µL de agua destilada durante 1 minuto.
10. Filtrar a los individuos expuestos a los tratamientos con partículas de 2 µm usando una membrana grabada con rastros de nucleoporos (Whatman, Reino Unido) de < 0.1 µm
11. Filtrar a los individuos tratados con MP de 15 µm se filtraron mediante una membrana grabada con rastros de nucleoporos (Whatman, Reino Unido) de < 10 µm usando un soporte de filtro de vacío de vidrio conectado a una bomba de aire manual.
12. Observar las membranas bajo un microscopio de epifluorescencia con un lente de 20x para comprobar la transferencia ontogénica y que los organismos hayan consumido MP.

## APÉNDICE C

### Biomagnificación trófica

1. Aclimatar 40 libélulas *Erythemis vesiculosa* adultas a las condiciones de laboratorio, asignándoles moscas para su alimentación.
2. Separarlas en 4 grupos de 10 individuos cada una, que corresponderán a los grupos “Control”, “Réplica 1”, “Réplica 2” y “Réplica 3”.
3. Los mosquitos sobrevivientes del ensayo anterior fueron separados en 2 grupos: “Mosq. Control” y “Mosq. Expuestos”.
4. Exponer los mosquitos a los 4 grupos de libélulas, de modo que el grupo control de mosquitos sea consumido por el grupo control de libélulas, y los del grupo de mosquitos expuestos sean consumidos por las libélulas de las réplicas.
5. Complementar la dieta de las libélulas con insectos como *Drosophila melanogaster*.
6. Luego de 14 días de exposición, contabilizar la supervivencia de las libélulas *Erythemis vesiculosa*, registrar su peso y se separarlas en 2 grupos: “Lib. Control” y “Lib. Expuestas”
7. En el segundo ensayo trófico, formar 3 grupos con 5 individuos de araña *Nephila clavipes* cada uno: los grupos “Control”, “Réplica 1”, “Réplica 2”.
8. Exponer la mitad de las libélulas colectadas a los 3 grupos de arañas, de modo que el grupo control de libélulas sea consumido por el grupo control de arañas, y los del grupo de libélulas expuestas sean consumidos por las arañas de las réplicas.
9. Complementar la dieta con insectos como *Drosophila melanogaster*.
10. Luego de 5 días de exposición, contabilizar la supervivencia de las arañas *Nephila clavipes*, registrar su peso y separarlas en 2 grupos: “Ara. Control” y “Ara. Expuestas”
11. En el tercer ensayo trófico, formar 2 grupos con 2 individuos cada uno con ranas *Physalaemus cuvieri*: los grupos “Control” y “Réplica 1”
12. Exponer la segunda mitad de las libélulas colectadas a los 2 grupos de ranas, de modo que el grupo control de libélulas sea consumido por el grupo control de ranas, y los del grupo de libélulas expuestas sean consumidos por las ranas de las réplicas.
13. Complementar la dieta con insectos como *Drosophila melanogaster*.

14. Luego de 5 días de exposición, contabilizar la supervivencia de las ranas *Physalaemus cuvieri*, registrar su peso y separarlas en 2 grupos: “Ra. Control” y “Ra. Expuestas”



## APÉNDICE D

### Digestión de los individuos

1. Realizar la disección del sistema gastrointestinal de las ranas y arañas.
2. Para la araña agregar 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a los tejidos recolectados.
3. Almacenar las muestras a temperatura ambiente por 7 días para desintegrar el tejido.
4. Añadir 16 g de HCO<sub>2</sub>K (99%) a la solución y agitar durante 4 horas para la separación de los tejidos blandos y líquidos disueltos.
5. Descartar la fase inorgánica, y filtrar el sobrenadante mediante filtros de membrana de nylon de 0.45 µm.
6. Almacenar el filtro en placas de Petri cubiertas con papel aluminio.
7. Secarlas a 50°C durante 2 días.
8. Para la ranas se empleó 20 mg de la enzima Creon por cada gramo de tejido seleccionado, además de los mismos reactivos empleados en la digestión del arácnido. Para el proceso de filtrado emplear un disco de filtro marca Whatman de 6 µm.
9. Para las libélulas emplear 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por cada individuo y reemplazar el HCO<sub>2</sub>K con 4.2 ml de NaOH. Filtros pueden ser iguales a los de ensayos en arañas.
10. Realizar la cuantificación de MP recolectados en las membradas mediante el empleo de microscopios EPI fluorescentes.