

Universidad Nacional Autónoma de México
Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Licenciatura en Nanotecnología

Caracterización de nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) y la evaluación de su toxicidad en dos líneas celulares *in vitro*.

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Licenciado en Nanotecnología

Presenta:

José Cristóbal Aguilar Guzmán

Director de Tesis:

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Ensenada, Baja California Septiembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. Sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto a sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

José Cristóbal Aguilar Guzmán

Dedicado:

A mis abuelos

A mis tíos y primos

A mi padre, madre y hermano

Y a mi yo del pasado que lloraba diciendo: No puedo

Agradecimientos

A la incansable hambre de crecer y superarse de mi madre, que sin aquella tácita instrucción y su infinito amor jamás hubiera tomado mi mochila y emprendido esta aventura.

A mi padre, quién marcó mi vida de tantas formas, pero sin duda lo que más le agradezco es su pasión y creatividad para construir y reparar cosas, hecho que marcó mi infancia y en este momento mi futuro.

A mi hermano, que siempre ha estado ahí protegiéndome, platicándome sobre la vida y que por más gris que se viera siempre me sacó una sonrisa.

A mi generación (2014-2018) por darme la oportunidad formar parte de esta gran familia, por permitirme aprender de cada uno y sobre todo por darme la perspectiva de que todos somos especiales y buenos para algo. Esos pequeños gustos y detalles nos identificaron y unificaron.

A Óscar, Alex, Santino, Sebastián, David, Lau y Soto: roomies, amigos y hermanos.

A Itzel Rubio, por su cariño, apoyo y sobre todo por ser mi compañera de vida.

A la Dra. Ana Rodríguez tutora y amiga, por su tiempo, dulces, conocimiento y calidez humana.

Al comité que se tomó el tiempo para revisar mi trabajo dándome sugerencias y comentarios: Dr. Rafael Vasquez, Dr. Roberto Sangines, Dr. Alejandro Huerta y Dr. Andrés Sarate.

A los técnicos de laboratorio, la Dra. Katrin Quester y la M.C. Itandehui Betanzo por su asistencia técnica y disposición en cuanto a materiales y equipos que se utilizaron en el desarrollo de este proyecto. Al Sr. Francisco Ruiz Medina y a Jaime Mendoza por su apoyo técnico con el microscopio electrónico de transmisión (MET). A la Dra. Ceres Molina, técnica del espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR) por su apoyo y buena charla. Al Dr. Roberto Sangines por su valioso tiempo en el Láser y por ser un excelente anfitrión de fiestas.

A Anita Misqueza por siempre estar al pendiente de los estudiantes, preparando todo lo necesario para las prácticas y estar al pendiente de nuestro desarrollo en el laboratorio.

A la coordinadora Dra. Laura Viana, que independientemente del motivo, me abrió las puertas de la licenciatura. A sus asistentes, Laura Rosales y Laura Osuna por siempre ayudarme, aunque con regaños. A sus compañeros de oficina Paco y Raúl quienes me brindaron su amistad.

A mis profesores de la carrera por servir de guía para consolidar mis conocimientos, por apasionarse por su materia y sobre todo por su tiempo.

Al proyecto CONACYT CB 251241 por el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la dicha de formar parte de la comunidad universitaria.

Contenido

1. Introducción	8
1.1 Plástico	8
1.2 Impacto del plástico en océanos	10
1.3 PET	12
2. Antecedentes	14
3. Justificación	15
4. Hipótesis	15
5. Objetivo general y específicos:	15
5.1 General	15
5.2 Específicos	15
6. Métodos	16
6.1. Nanopartículas de PET	16
6.1.1. Obtención de nanopartículas de PET mediante ablación láser	16
6.1.2. Obtención de nanopartículas de PET vía erosión por arena y diferentes soluciones	16
6.1.3 Espectrometría infrarroja (FTIR)	17
6.1.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	17
6.1.5. Espectroscopía de Luz Dinámica (DLS)	17
6.2. Ensayos de toxicidad <i>in vitro</i>	18
6.2.1. Líneas celulares	18
6.2.1.1. Líneas celular HCT15	18
6.2.1.2. Líneas celular RAWBlue	18
6.2.2 Mantenimiento de las líneas celulares	18
6.2.3. Viabilidad celular	19
6.2.4. Proliferación celular	20
6.2.5 Fagocitosis	20
6.2.6. Activación de receptores tipo Toll (TLR's) de macrófagos (<i>Raw Blue</i>)	22
6.3. Análisis morfológico de las células	22
7. Resultados y discusión	23

7.1 Análisis sobre el efecto de la abrasión del PET con agua marina y otras soluciones en presencia y ausencia de arena.	23
7.2 Análisis mediante FTIR	24
7.3. Análisis estructural de las nanopartículas de PET, mediante MET	26
7.4. Análisis de las muestras mediante DLS	28
7.5 Análisis biológico	28
7.5.1 Viabilidad celular	28
7.5.2 Proliferación celular	29
7.5.3 Fagocitosis	30
7.5.4 Activación de macrófagos	31
7.6 Microscopia de luz (<i>Contraste de fases</i>)	32
8. Conclusiones	35
9. Perspectivas	36
Bibliografía	37
Anexo	39
Índice de figuras y tablas	40
Glosario de abreviaturas	41

1. Introducción

1.1 Plástico






En la actualidad, el consumismo es una cultura globalizada que nos mantiene lejos de nuestro sentido de necesidad y nos brinda el deseo constante de adquirir objetos realmente innecesarios. La mayor cantidad de objetos que se sintetizan hoy en día por los grandes imperios comerciales se basan en materiales con los que ya estamos profundamente familiarizados, los plásticos.


Los plásticos sintéticos, principalmente los polímeros derivados de procesos petroquímicos, son una gran familia de materiales que se ha expandido vertiginosamente a lo largo del último siglo. Esto se debe a que sus propiedades fisicoquímicas les confieren una amplia versatilidad tanto en su síntesis como en su aprovechamiento.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define como plástico a un “material polimérico que puede contener otras sustancias para mejorar su desempeño y/o reducir costos”. Por lo general, se resaltan características como el alto peso molecular, su capacidad como aislantes eléctricos, plasticidad, resistencia a la temperatura, ciertas ondas electromagnéticas y a una gran cantidad de solventes además de la facilidad de su manufactura, bajos costos, y producción en la forma y tamaño deseados (Vert et al., 2012).

Una forma de clasificar a los plásticos es dividiéndolos con base en su composición química. Una categoría consta de polímeros que únicamente tienen átomos de carbono alifáticos en su cadena principal. Un ejemplo es el polipropileno, un polímero comúnmente utilizado para empaquetar alimentos y hacer juguetes. La segunda categoría consta de plásticos creados por polímeros de heterocadenas, los cuales contienen átomos como el oxígeno, nitrógeno o azufre en su cadena central, además del carbono. Un ejemplo de ellos es el tereftalato de polipropileno (PET) cuyas características serán presentadas más adelante por ser nuestro sujeto de estudio (Rodríguez, 2017). También se pueden clasificar de acuerdo a códigos y a sus potenciales aplicaciones como podemos ver en la tabla 1.

Tabla 1 Tipos de plástico y sus aplicaciones.

Tipos	Códigos de identificación		Aplicaciones	Uso después del reciclado
Tereftalato de polietileno	PET		Botellas, envasado de productos alimenticios, moquetas y refuerzos neumáticos de coches.	Textiles para bolsas, lonas y velas náuticas, cuerdas, hilos, etc.
Polietileno de alta densidad	PEAD		Botellas para productos alimenticios, detergentes, contenedores, juguetes, bolsas, embalajes y film, laminas y tuberías.	Bolsas industriales, botellas detergentes, contenedores y tubos.
Polietileno de baja densidad	PEBD		Film adhesivo, bolsas, revestimientos de cubos, recubrimientos contenedores flexibles, tuberías de riego, etc.	Bolsas para residuos, e industriales, tubos, contenedores, film uso agrícola, vallado, etc.
Policloruro de vinilo	PVC		Marcos de ventanas, tuberías rígidas, revestimientos para suelos, botellas, cables aislantes, tarjetas de crédito, productos de uso sanitario, etc.	Muebles de jardín, tuberías, vallas, contenedores, etc.
Polipropileno	PP		Envases para productos alimenticios, cajas, tapones, piezas de automóviles, alfombras y componentes eléctricos.	Cajas múltiples para transporte de envases, sillas, textiles, etc.

Poliestireno	PS		Botellas, vasos de yogures y recubrimientos.	Aislamiento térmico, cubos de basura, accesorios de oficina, etc.
--------------	----	---	--	---

La versatilidad del plástico en el mundo moderno, ha propiciado una demanda cada vez más grande de estos materiales, tanto así que pueden ser comúnmente utilizados tanto en el hogar como en procesos o dispositivos requeridos en la industria aeroespacial, reemplazando así materiales como el vidrio y metales (Hallion, 1982). La demanda de este tipo de materiales es tan grande que, de acuerdo con estudios recientes realizados por la empresa *PlasticsEurope*, la producción anual global ha crecido 49% en tan solo en 10 años, alcanzando la descomunal cifra de 311 millones de toneladas de plástico producidas solamente en 2014. Pero lo que es realmente alarmante es que la mayor cantidad de plástico producido en el mundo se utiliza principalmente para el empaquetamiento de objetos o productos desechables de un solo uso. Esto ha generado una acumulación inconmensurable de residuos que si no son debidamente tratados (situados en vertederos o reciclados) terminan incorporándose a cuerpos de agua que desembocan en el mar. (EPRO, 2015)

1.2 Impacto del plástico en océanos

En el último siglo, se han observado varios cambios en la superficie de nuestro planeta, pero uno de los más drásticos es la ubiquidad y acumulación de desechos plásticos en diversas zonas de la corteza terrestre (Figura 1). De acuerdo con estudios recientes, el plástico es el tipo de desecho antropogénico dominante que se encuentra en todo el entorno marino. Las autoridades de varios países ya están al tanto de este problema, sin embargo, la producción de estos materiales en lugar de disminuir va al alza. (Barnes et al., 2009)



Figura 1. Ejemplo de la ubiquidad del plástico en la corteza terrestre (Fotografía: Xinhua).

Sin menospreciar el problema estético, el plástico se ha convertido en un serio problema para la vida silvestre debido a que es causante de enredos y asfixia, además de que puede persistir allí durante años. Otro hecho importante es que el número de efectos potencialmente dañinos de los desechos plásticos que se han identificado, se han intensificado, puesto que estos elementos también pueden transportar contaminantes orgánicos como pesticidas (Mato et al., 2001), acarrear especies no autóctonas a nuevas ubicaciones (Barnes et al., 2002) y distribuir algas asociadas con mareas rojas (Masó et al., 2003).

El plástico, al estar en contacto con el ambiente, puede sufrir una gran cantidad de interacciones tanto físico-químicas como biológicas que van desde el rompimiento de los enlaces entre sus monómeros hasta otras transformaciones químicas subsecuentes. Este fenómeno es conocido como degradación polimérica e implica cambios en las propiedades del material, como lo son su estabilidad térmica, propiedades mecánicas y cristalinidad. (Pospíšil, 1998) De acuerdo a la naturaleza del cambio, la degradación polimérica se puede clasificar como degradación foto oxidativa, degradación térmica, degradación inducida por ozono, degradación mecano química, degradación catalítica y biodegradación. (Rånby, 1989) Sin duda la suma de estos efectos cataliza la generación de macro-, micro-plásticos (Singh & Sharma, 2008) y como se estudió en este trabajo, también la generación de nano-plásticos.

La acumulación tanto de macro- como de micro-plásticos se ha incrementado constantemente en costas y sedimentos durante las últimas décadas. (Thompson, 2004) Sin embargo, las acumulaciones más representativas son las denominadas Islas de Basura. Estas islas, son grandísimos vertederos de basura originados por desagües de cuencas hidrográficas y las corrientes marinas que acarrean a todo tipo de materiales que entran en contacto con cuerpos de agua y son dirigidos a vertederos flotantes (Ryan, 2004). La gran mancha de basura del pacífico(GPPG) es uno de estos vertederos, cuenta con un área superficial de casi 1.6 millones de metros cuadrado (prácticamente la extensión superficial de Estados Unidos) y está constituida principalmente por plásticos, más específicamente por poliestireno (PS) y tereftalato de polietileno(PET) (da Costa et al., 2016).



Figura 2. Residuos de plástico en el borde de una playa en Filipinas (Fotografía: AFP/Noel Celis)

1.3 PET

Al observar el panorama en el que nos encontramos, se justifica el estudio del PET para determinar su impacto ambiental. Primero, el PET es un polímero plástico usado extensivamente como fibras, películas y material de moldeo. El cuarenta por ciento de las fibras sintéticas demandadas por el mundo están constituidas por PET. Dicho esto, aproximadamente 41.56 millones de toneladas métricas de PET fueron producidas en 2014 y se pronostica que para 2020 su producción será aproximadamente 73.39 millones de toneladas métricas(NCES, n.d.).

El PET es un plástico con una densidad ligeramente superior al del agua y muy versátil. Cuando se sintetiza en forma de filamentos puede utilizarse en grado textil de manera industrial para hilar neumáticos de automóviles, crear cintas transportadoras, correas de transmisión, refuerzos para mangueras, cinturones de seguridad, pañales desechables, alcantarillas, camas, etc. (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2018). Pero los objetos más utilizados son los contenedores transparentes, principalmente botellas, de alta resistencia, que son virtualmente impermeables al gas y líquidos y además su uso está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de E.U.A., como un material seguro que no interactúa con el alimento que contiene (U.S. Food and Drug Administration, 2017). De manera que el PET es la fibra artificial más importante en producción por volumen y costo.

Existen estudios enfocados en examinar cómo se ingieren o se acumulan los microplásticos en organismos acuáticos como los mamíferos marinos (Eriksson 2003, Fossi 2012 y 2014), las tortugas marinas (Clukey 2017, Pham 2017), las aves (Reynolds 2018, Nicastro 2018) y los peces (Boerger 2010), ya que estos micro-pellets también se han encontrado en sedimentos a orillas de lagos, ríos y lagunas (Eriksen 2013), en proporciones y densidades comparables a las encontradas en los océanos; los cuales indudablemente serán ingeridos por diferentes tipos de fauna (Sánchez 2014), tanto acuática como terrestre.

Sin embargo, existen pocos y muy recientes estudios a nivel mundial, enfocados en la acumulación de los nano-partículas de plástico, que indudablemente terminaran formando parte de las manchas de basura. Se ha observado que los micro y nano-plásticos son vehículos para algunos otros contaminantes, como pesticidas (Pinto 2016), metales pesados (Holmes 2012) o el bifenilos policlorados (Rochman 2013); los cuales son adsorbidos en la superficie de diferentes polímeros. Este tipo de complejos (nanopartícula/contaminante) han sido encontrados entre la basura plástica, con concentraciones 100 veces mayores a las encontradas en los sedimentos y hasta 1 millón de veces más que la que se ha estimado en el mar (Rochman 2013). Indudablemente estas nanopartículas de plástico (conocidos como nano-pellets) entraran a la cadena alimenticia por múltiples vías, siendo la ingestión una de las que ha ocasionado mayor preocupación. Los estudios más recientes se han enfocado hasta el momento, en probar su presencia y acumulación en diversos especímenes.

2. Antecedentes

Recientemente han reportado trabajos de investigación en los cuales se analiza la incorporación de nano-partículas de plásticos dentro de diferentes especies de organismos marinos así como de aguas continentales. Lee y colaboradores encontraron que los micro-pellets de poliestireno tenían un efecto tóxico conforme disminuye su tamaño (de 6 a 0.05 μm) en *T. japonicus*, afectando incluso su ciclo reproductivo (Lee 2013). De igual forma Ma y colaboradores (Ma 2016), Chae y An (Chae & An 2017), Bergami y col. (Bergami 2016) Besseling y col (Besseling 2014; 2017), y Della Torre y col (Della Torre 2014) concluyen que los nano-partículas de este mismo material tienen un impacto negativo en diferentes especies de zooplancton marino tal como copépodos, quetognatos, y crustáceos planctónicos como *Daphnia magna* (que habita en ambientes acuáticos continentales), embriones y larvas de peces y camarones o salpas con partículas ingeridas menores a 70 nm.

3. Justificación

La contaminación por plásticos representa un problema al ambiente y a la salud pública. El impacto de las nano-partículas de plástico en organismos complejos está lejos de haber sido completamente evaluado. Siendo el tereftalato de polietileno (PET) uno de los plásticos más producidos y dispersados en el ambiente, hay gran preocupación a nivel mundial ya que representa un potencial peligro ambiental y a la salud pública; en la presente propuesta pretendemos estudiar en un modelo *in vitro*, el efecto de nanopartículas de plásticos (PET) en dos tipos de células las cuales tienen como función actuar como barreras físicas (células epiteliales) o cuya función principal es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo (macrófagos).

4. Hipótesis

Las nanopartículas de PET, tendrán un efecto en la respuesta celular de macrófagos (RAW) y epiteliales de colon (HCT15) *in vitro*, influyendo en su viabilidad, proliferación y sus mecanismos de internalización.

5. Objetivo general y específicos:

5.1 General

Evaluar el efecto celular de nanopartículas de PET obtenidas por ablación láser en un modelo *in vitro* con dos líneas celulares.

5.2 Específicos

- Obtener nanopartículas de PET por ablación láser.
- Caracterizar las propiedades fisico-químicas de las nanopartículas obtenidas.
- Analizar el grado de toxicidad celular en ensayos *in vitro* con macrófagos y células epiteliales.

6. Métodos

6.1. Nanopartículas de PET

6.1.1. Obtención de nanopartículas de PET mediante ablación láser

Las NP fueron obtenidas mediante ablación láser, siguiendo el esquema de la Figura 3. Una placa de 8 cm de diámetro de PET (Recortada de una botella de plástico comercial) fue sumergida en 100ml de agua Milli-Q dentro de un vaso de precipitado a 5mm por debajo de la superficie, la cual fue irradiada con un láser que contiene un granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio (Nd:YAG) pulsado (duración del pulso: 6 ns) a una frecuencia de repetición de 10 Hz, con una energía de 100mJ, cuya longitud de onda fundamental es de 1064 nm, pero se utilizó un doblador de frecuencia para emitir en 532 nm. La síntesis se realizó durante 30 min, con intervalos de 30 segundos por zona. A lo largo de este trabajo llamaremos a la muestra de nanopartículas de PET sintetizadas mediante ablación láser como “*SPET*”.

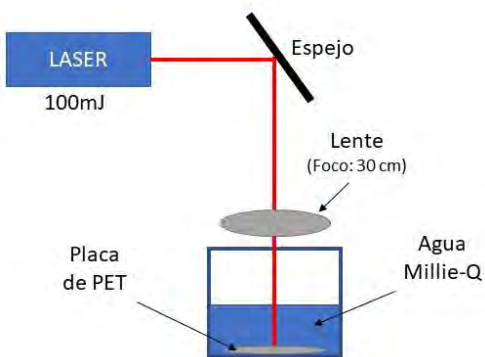


Figura 3. Representación esquemática del proceso de obtención de nanopartículas por ablación láser.

6.1.2. Obtención de nanopartículas de PET vía erosión por arena y diferentes soluciones

En matraces de 250 ml se agregaron las mezclas de la tabla 1. Posteriormente fueron sellados e incubados con agitación constante (200 rpm) a 37°C durante 14 días. La arena y agua de mar fueron extraídas de Playa Hermosa, Ensenada, Baja California. En el caso de la muestra E, se trató de simular la composición del agua de mar incorporando NaCl (3,5 g/L, la cual corresponde a la concentración de este compuesto en el mar) (Xie, 1997)

Tabla 2 Mezclas de PET con diferentes soluciones

Muestra	Mezclas			
A	PET (5g)	Agua de mar (100 mL)		
B	PET (5g)	Agua Milli-Q (100 mL)		
C	PET (5g)	Agua Milli-Q (100 mL)	Arena (5g)	
D	PET (5g)	Agua de mar (100 mL)	Arena (5g)	
E	PET (5g)	Agua Milli-Q (100 mL)	Arena (5g)	NaCl (3.5g)

6.1.3 Espectrometría infrarroja (FTIR)

Fueron seleccionadas las muestras A, D y E debido a los resultados del protocolo pasado y la muestra SPET para ser sometidas a caracterización mediante espectrometría infrarroja con ayuda del equipo Cary 660®(Agilent) con el accesorio ATR modelo MIRacle de Pike para determinar la presencia de PET.

6.1.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las nanopartículas obtenidas por ablación laser, así como las que se produjeron por erosión en agua de mar en presencia de arena; fueron observadas por Microscopía Electrónica de Transmisión. Se colocaron 2 µL de cada muestra sobre una rejilla para MET (Support films carbón Type-B 300 mesh) de cobre (Del segundo método se analizó solamente la muestra 4 debido a la presencia de opacidad en la placa y la posible presencia de PET en la mezcla). Se dejó secar a 30 °C durante 20 minutos y finalmente se observaron mediante un microscopio JEM-2010 de Alta Resolución de la marca JEOL.

6.1.5. Espectroscopía de Luz Dinámica (DLS)

Se realizaron mediciones DLS a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), con un Zetasizer Nano ZS® (Malvern), para así determinar el diámetro de las nanopartículas en la muestra SPET.

6.2. Ensayos de toxicidad *in vitro*

6.2.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron escogidas especialmente por ser una de las principales líneas de exposición ante antígenos y son comúnmente utilizadas para identificar la citotoxicidad de nuevos materiales.

6.2.1.1 Línea celular HCT15

Las células HCT15 son adenocarcinoma de colon humano, Dukes' tipo C. El medio de mantenimiento que se utilizó fue Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Mayimex) y antibiótico-antimicótico (anti-anti) al 1% (Sigma Aldrich).

6.2.1.2 Línea celular RAWBlue

Las células *RAW-Blue*TM son derivadas de macrófagos RAW264.7 de murinos con la integración cromosómica de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF- κ B y AP-1. Además, expresa muchos receptores de patrones de reconocimiento (PRRs), incluyendo receptores toll (TLRs), receptores NOD (NLRs), receptores RIG-I (RLRs) y receptores de lectina tipo C (CLRs). El medio de cultivo utilizado fue DMEM, suplementado con 10% de SFB (Mayimex), Normocin (Invitrogen) a 1% y Zeocina (Invitrogen) a 1%.

6.2.2 Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas se encontraban en tubos de criopreservación por lo que fue necesario descongelarlas y sembrarlas dándoles seguimiento. Primero que nada, se descongeló el criotubo rápidamente para luego verter el contenido en un tubo FalconTM previamente llenado con 4 ml de medio de cultivo y 4 ml de PBS 1X. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Mientras tanto, se preparó una placa de cultivo de 5cm de diámetro con 4 ml de medio de cultivo. Posteriormente se retiró el sobrenadante del tubo FalconTM, se agregó 1 ml de medio de cultivo para resuspender a las células y por último verterlas en la placa preparada previamente.

El mantenimiento de las líneas celulares se llevó a cabo siguiendo la guía de mantenimiento de cultivo celular de Thermo Fisher Scientific (Guidelines for Maintaining Cultured Cells). Se destaca la higiene y la esterilidad de todo el material utilizado.

Para realizar los ensayos *in vitro* fue necesario disociar a las células adheridas en la superficie de las placas de cultivo, en el caso de la línea HCT15 se utilizó tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y en el caso de la línea RAWBlue se disociaron mecánicamente utilizando un raspador. Luego, se contó el número de células mediante el uso de la cámara de Neubauer y considerando el total de células se realizaron los subsecuentes ensayos con un total de 100,000 células por pozo exceptuando los blancos.

Las células que sobraron en cada ensayo fueron crio-preservadas y etiquetadas.

6.2.3. Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad de la línea celular HCT15 en presencia de la muestra SPET se realizó un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo AlamarBlue®(SigmaAldrich) (el color del medio en cada muestra cambiará de acuerdo con la reducción del compuesto rezasuina a resorufina presente en el reactivo AlamarBlue). Se colocaron por triplicado los siguientes pozos prueba: 140 µl de medio con células más 10 µl de SPET, así como 140µl de medio con células más 10 µl de DMSO como control negativo de viabilidad (C-) y 150 µl de medio con células como control positivo (C+). También se realizó una curva de células por triplicado de 100,000, 50,000, 25,000, 12,500, 6,250 y 0 células por pozo (Figura 4). Luego la placa fue incubada a 37°C (en atmósfera con 5% CO₂). Posteriormente, pasadas 16 horas se depositaron 15µl del reactivo AlamarBlue®(SigmaAldrich) a todos los pozos. Pasadas las 24 horas se determinó la densidad óptica a una longitud de 570 nm.

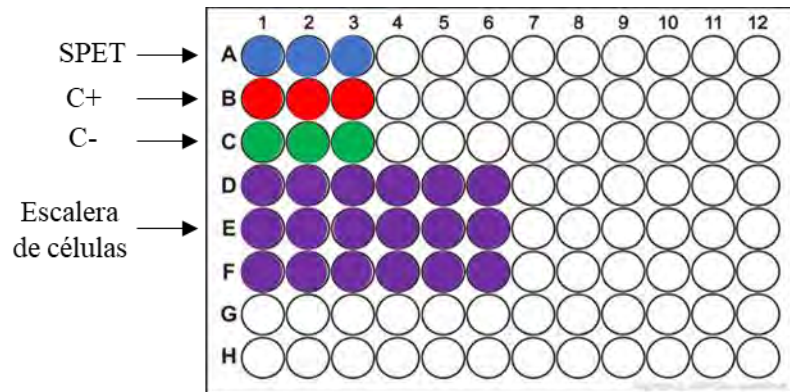


Figura 4. Esquema representativo del ensayo de viabilidad celular

Para observar la viabilidad celular de la línea celular RAWBlue ante nuestra muestra SPET se realizó el mismo protocolo.

6.2.4. Proliferación celular

Para observar la proliferación celular de la línea celular HCT15 en presencia de nuestra solución de NP's de PET se realizó un ensayo colorimétrico utilizando, al igual que el protocolo pasado, el reactivo AlamarBlue®(SigmaAldrich). Se depositaron por nóuplo en una placa de 96 pozos las siguientes pruebas: 140 µl de medio con células más 10µl de SPET, 140 µl de medio con células más 10 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 150µl de medio con células. Luego la placa fue incubada a 37°C (5% CO₂). Posteriormente, 8 horas antes de las 24 horas se depositaron 15µl del reactivo AlamarBlue® a las primeras 3 muestras por triplicado y se volvieron a incubar. Pasadas las 24 horas se tomó el sobrenadante de las muestras a las que se les agregó el reactivo y se depositaron en una nueva placa de 96 pozos para determinar su densidad óptica a una longitud de 570 nm (Al ser un ensayo colorimétrico, el color del medio en cada muestra cambiará de acuerdo a la reducción del compuesto rezasurin a resorufina presente en el reactivo AlamarBlue). Se repitió el mismo proceso cada 48 y 72 horas (Figura 5).

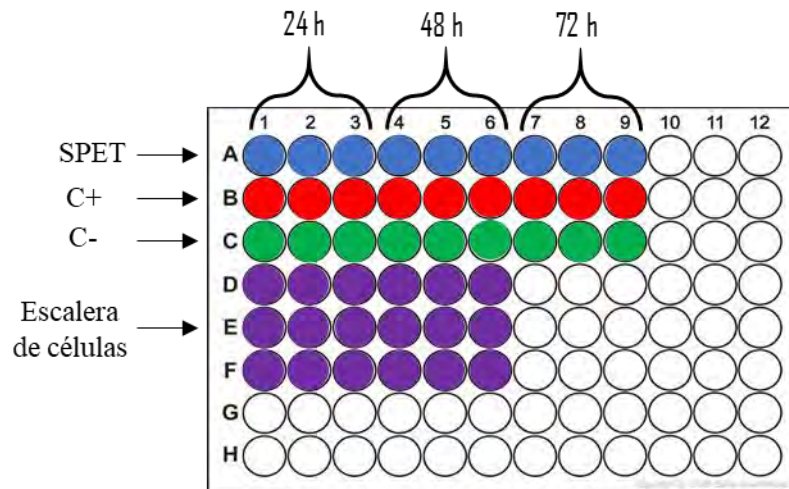


Figura 5. Esquema representativo del ensayo de proliferación celular

Para observar la proliferación celular de la línea celular RAWBlue ante nuestra SPET se realizó el mismo protocolo.

6.2.5 Fagocitosis

Para analizar la actividad fagocítica de macrófagos se llevó a cabo el protocolo para la evaluación de la concentración de óxidos de nitrógeno (NO). Se determinó la concentración de nitritos (NO₂⁻) que es uno de los dos productos de la transformación de

óxido de nitrógeno y que es no volátil. Primeramente, se colocaron por nóuplo en tres experimentos independientes los siguientes pozos prueba: 140 μl de medio con células más 10 μl de SPET, así como 140 μl de medio con células más 10 μl de DMSO y 150 μl de medio con células a modo de controles. En la misma placa se realizó por triplicado una curva patrón de nitritos con las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0 μM . inmersas en medio DMEM suplementado con SFB 10% (50 μl en total). Luego la placa fue incubada a 37°C (5% CO₂).

Pasadas 24 horas a las primeras 3 muestras por triplicado fueron sometidas a la prueba de GREISS (Promega ®), la cual permite determinar la concentración de nitritos en el sobrenadante de nuestros pozos problema. Esta prueba consiste en tomar 50 μl de cada pozo, depositarlo en una nueva placa y agregarle 50 μl de sulfanilamida. Posteriormente se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Pasado este tiempo se agregan 50 μl de solución de dihidrocloruro de N-1-naptoletildiamina (NED) a todos los pozos y se dejó incubar nuevamente durante 10 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz (Figura 6). Inmediatamente después se determinó la densidad óptica a 540 nm Se realizó el mismo proceso a las 48 y 72 horas.

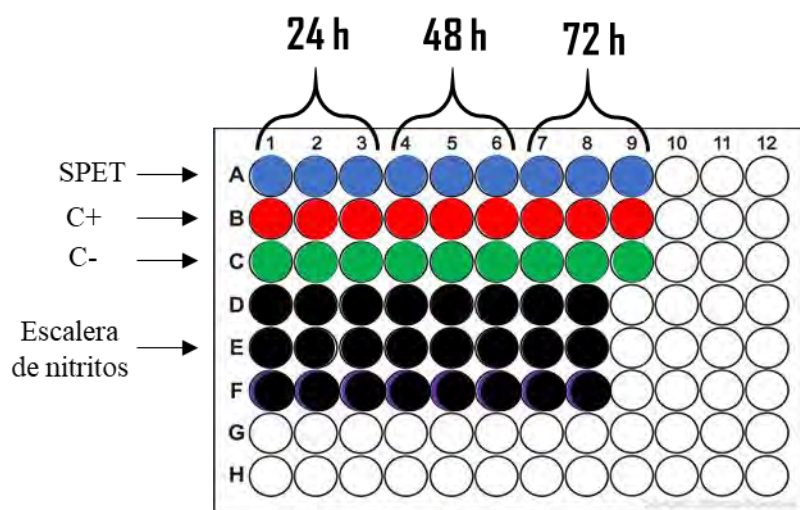


Figura 6. Esquema representativo del ensayo de fagocitosis.

Por último, se determinó la concentración de nitritos en cada una de las muestras problema mediante la correlación de su absorbancia con la curva patrón. La concentración de nitritos es directamente proporcional a la generación de óxido de nitrógeno.

6.2.6. Activación de receptores tipo Toll (TLR's) de macrófagos (*Raw Blue*)

Para analizar la estimulación de los macrófagos como inicio de la respuesta inmune se utilizó el reactivo Quantity Blue (InvitroGen ®) en células RAW-Blue Cells ® para observar la activación de NF-kB y/o AP1 vía receptores TLR o NOD, midiendo la expresión de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo. Para esto, se colocó la muestra de 10µl de SPET obtenidas vía ablación láser con las células RAW, junto con un control de lipopolisacáridos (75ng/ml) (Activan este tipo de receptores (Lopes Pires, 2017)) y un control de únicamente células en placas multipozos de 96 y se incubaron por 12 horas a 37°C (en atmósfera con 5% CO₂) (Figura 7). Pasado el tiempo de incubación, se retiraron 50 µL de sobrenadante a los cuales se le colocaron 150 µL del reactivo QUANTI Blue (Invivo Gen®), se incubó por espacios de 60 minutos a 37°C protegido de la luz y se midió la absorbancia a 655 nm (Al ser un ensayo colorimétrico, el color del medio en cada muestra cambiará de acuerdo con la producción de fosfatasa alcalina lo cual se puede censar utilizando esta longitud de onda).

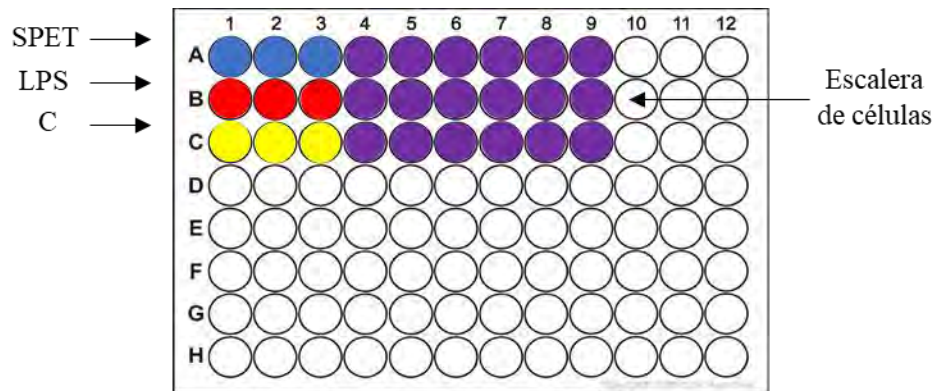


Figura 7. Esquema representativo del ensayo de activación de receptores tipo Toll de macrófagos.

6.3. Análisis morfológico de las células

Para analizar la morfología de las células HCT15 y RAW al estar en contacto con 10µl de nuestra muestra SPET se obtuvieron una serie de fotografías a 24, 48 y 72 horas con un objetivo de 40x utilizando un microscopio Axio Observer.A1® (ZEISS) y una cámara AxioCam ICc5® (ZEISS).

7. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la demostración de efecto que tiene el mar y la arena en el proceso de degradación del PET y el tamaño de partícula que se obtiene por estos procesos. Este último dato, fue la referencia necesaria para establecer las condiciones requeridas para obtener unas nanopartículas de composición única de PET mediante ablación láser, a las cuales se les determinó alguna de sus propiedades fisicoquímicas y su efecto biológico in vitro con dos líneas celulares.

7.1 Análisis sobre el efecto de la abrasión del PET con agua marina y otras soluciones en presencia y ausencia de arena.

En la Figura 8 se puede observar el efecto de las diferentes soluciones en las que fueron incubadas las placas de PET durante 14 días en agitación constante (200 rpm) y temperatura de 37°C.

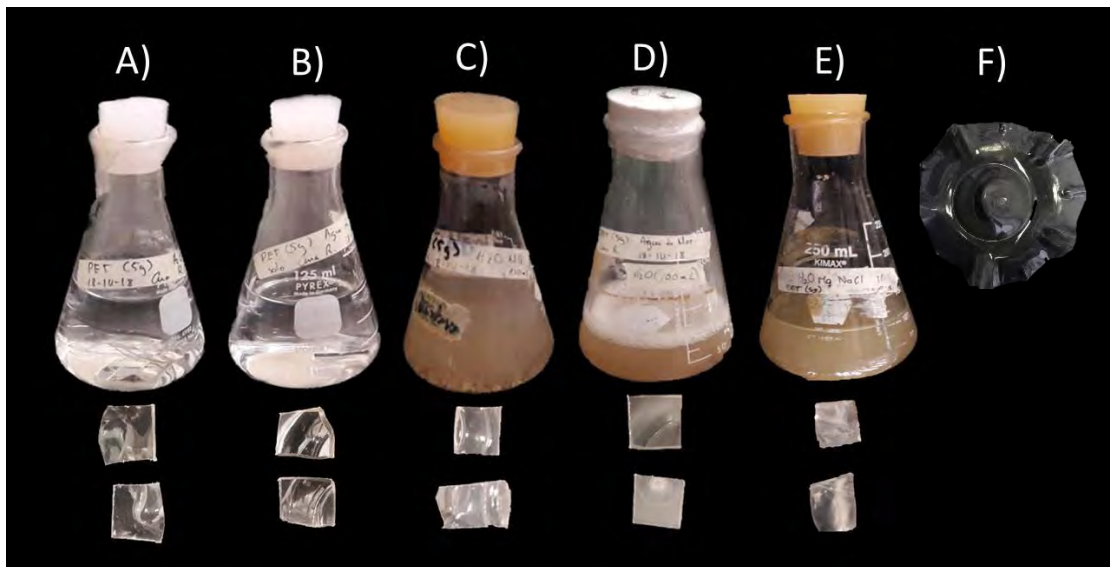


Figura 8. Comparación de muestras de PET sometidas a agitación constante durante 24 días inmersas en A) Agua de mar, B) Agua milli-Q, C) Agua milli-Q con arena, D) Agua de mar con arena, E) Agua milli-Q con arena y NaCl y F) el blanco. Para evidenciar el daño ocasionado en la superficie de la muestra.

Se puede apreciar que en las muestras **a y b** la apariencia de las placas de PET son prácticamente las de nuestro blanco. Caso contrario ocurre en las muestras **c d y e** en las cuales se nota claramente la opacidad de las placas de PET, destacando que en la muestra **e** se agregó la cantidad de cloruro de sodio necesaria para mimetizar la concentración situada en los océanos. Otra cosa importante es que el agua de los matraces que contenían arena se volvieron turbias, esto debido a la meteorización de la arena producto a la interacción entre

ella misma y el PET (Stallard, 1995). Con base en esto podemos intuir que en las muestras *d* y *e* la opacidad puede deberse a una suma de interacciones. La primera, es el proceso de erosión mecánica que implica la meteorización entre la arena y el PET, efecto que posiblemente potencialice la segunda interacción. Ésta es la del agua de mar y el PET, ya que a nivel molecular el agua puede difundirse en el polímero y producir algún tipo de estrés o ruptura en su matriz o en alguna interfase. (Rege & Lakkad, 1983)

7.2 Análisis mediante FTIR

El principio básico detrás de la espectrometría molecular es que las moléculas absorben energía de la luz en longitudes de ondas específicas, conocidas como sus frecuencias de resonancia (vibración). Basado en esto podemos conocer la naturaleza de los enlaces químicos y por ende la composición química de muestras sólidas y líquidas.

En la Figura 9 se presenta el análisis químico de las diferentes muestras de nanopartículas mediante FTIR. Al analizar los resultados, se observa que las nanopartículas provenientes del tratamiento con agua presentan picos en 3328 correspondientes a los enlaces O-H del agua, además de un pico en 2345 característico del enlace O=C=O. Las muestras en general presentan un pico de 1712 correspondiente a C=O y dos picos entre 1265 y 1099 característicos del enlace (C=O)-O. Estos mismos picos empatan con los encontrados en el espectro que nos revela nuestro blanco de PET exceptuando los puntos en 1750 característicos al enlace C=C y en 750 que pertenece a los enlaces C-H.

Presentado lo anterior, se observa que los espectros que más empatan con el blanco de PET son las muestras extraídas de la solución con agua de mar y arena junto con la sintetizada vía ablación láser, aunque no se encuentran todos los picos representativos del material completamente empatados es posible que la sensibilidad del equipo se viera afectada debido a que el PET se encontrase inmerso en el agua en muy pequeñas cantidades, sumado a la humedad de ambiente. Esta evidencia corrobora la erosión mecánica del PET debido a su interacción con el mar y la arena, además de la viabilidad de sintetizar nanopartículas de PET mediante la técnica de ablación láser.

Con base en los resultados anteriores se seleccionaron las muestras de nanopartículas obtenidas tanto por ablación laser como por erosión mecánica con arena para los siguientes análisis.

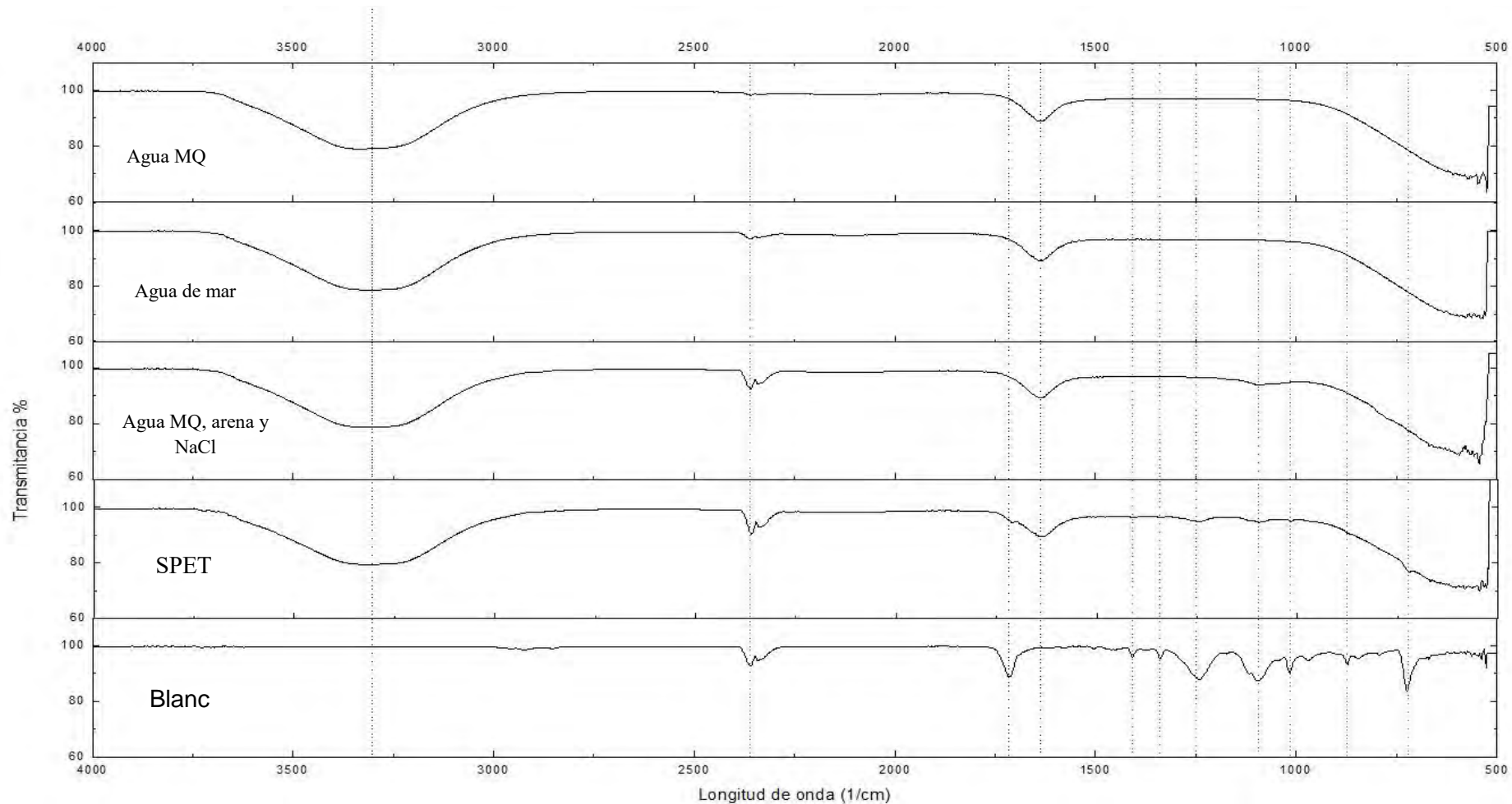


Figura 9. Espectro infrarrojo de nanopartículas de PET con agua Millie-Q (Muestra A), agua de mar (muestra D), agua Milli-Q, arena y NaCl (muestra E), SPET y blanco. Las líneas negras muestran los picos que tienen en común las muestras mientras que las rojas muestran los picos característicos del blanco de PET, que se identificaron en la muestra de ablación laser.

7.3. Análisis estructural de las nanopartículas de PET, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión

En la figura 10, podemos observar las imágenes obtenidas por MET de las nanopartículas obtenidas por erosión en agua de mar y arena, en las cuales es posible identificar dos tipos de partículas: unas simétricas con forma cilíndrica (enmarcadas en rectángulos) y otras con formas más irregulares con diferente relieve (delimitadas con un círculo blanco) del orden de los 100 a 350nm.

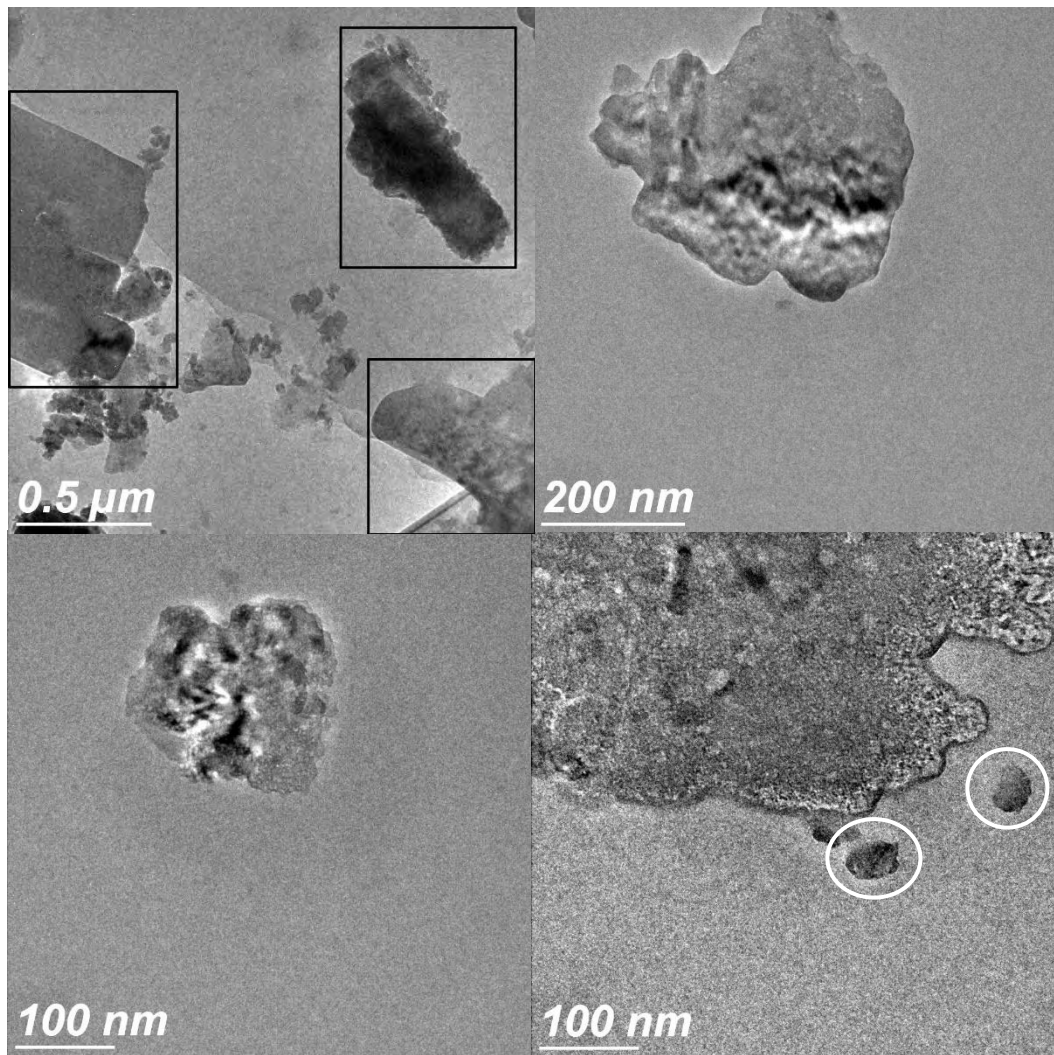


Figura 10. Micrografías obtenidas mediante MET de solución de arena, agua de mar y PET (muestra b).

Al tener contrastes poco homogéneos nos da un indicio de la presencia de PET en forma de micro y nanopartículas. Sin embargo, es posible que la muestra contenga además partículas diferentes provenientes de la arena.

A continuación, se presentan micrografías obtenidas al analizar la muestra de nanopartículas de PET sintetizadas mediante ablación láser (Figura 11). En estas micrografías es posible observar una gran cantidad de nanopartículas cuasi-esféricas del orden de 20 a 30 nm, obtenido y calculado con el software ImageJ®.

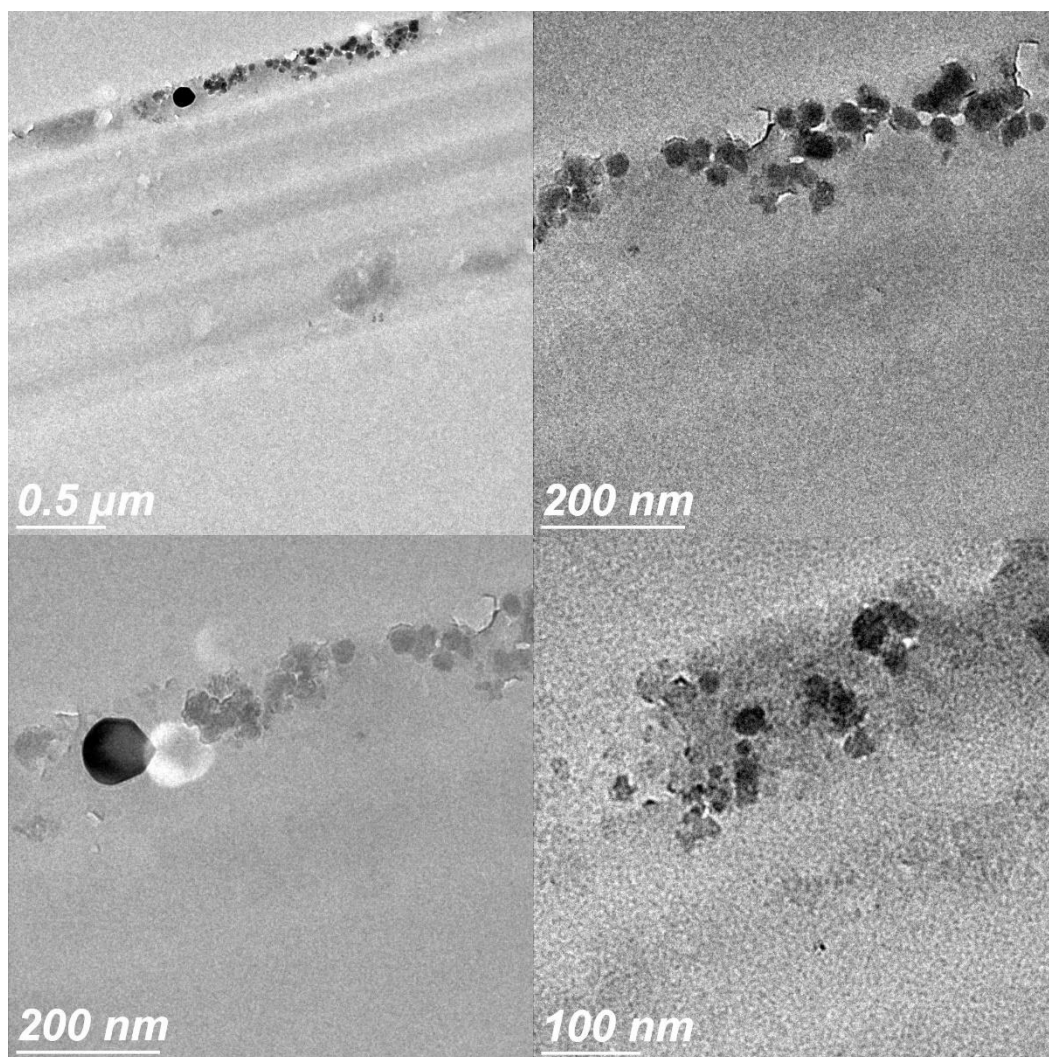


Figura 11. Micrografías obtenidas mediante MET de nanopartículas de PET a diferentes magnificaciones.

7.4. Análisis de las muestras mediante DLS

En el caso de la muestra por erosión, no fue posible hacer una medición por DLS, ya que la turbidez del medio y la presencia de partículas con dimensiones en la escala de micras impedía la identificación de las nanopartículas presentes en la solución.

Pero en el caso de las muestras de ablación láser (SPET), fue posible identificar tanto micropartículas como nanopartículas como se observa en la Figura 12. Las partículas posiblemente se aglomeran en cúmulos muy grandes al estar inmersas en agua sin embargo es posible localizar partículas del mismo tamaño a las debeladas mediante MET.

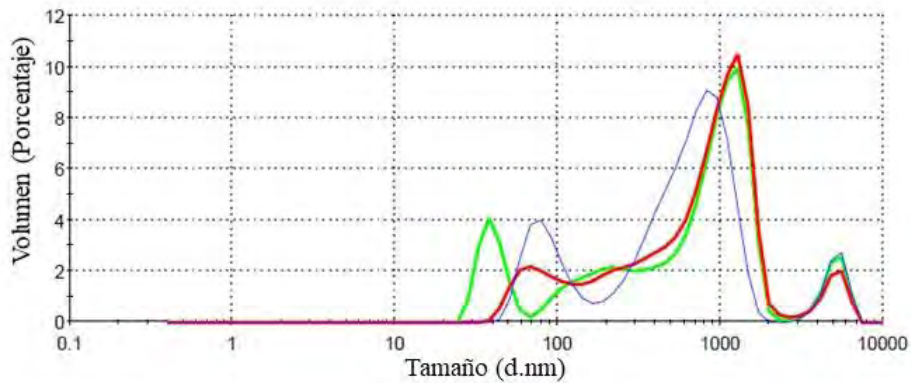


Figura 12. Distribución de partículas de la muestra SPET mediante DLS.

El conjunto de caracterizaciones nos permite corroborar la presencia de nanopartículas de SPET en la solución sintetizada mediante ablación láser, misma que fue utilizada para realizar los protocolos biológicos siguientes.

7.5 Análisis biológico

En este apartado se analiza la interacción de una muestra de 10 μ l de la solución de nanopartículas de PET sintetizada mediante ablación láser.

7.5.1 Viabilidad celular

En la Figura 13 se presentan las absorbancias producto del ensayo de viabilidad celular de las líneas celulares HCT15 y RAWBlue.

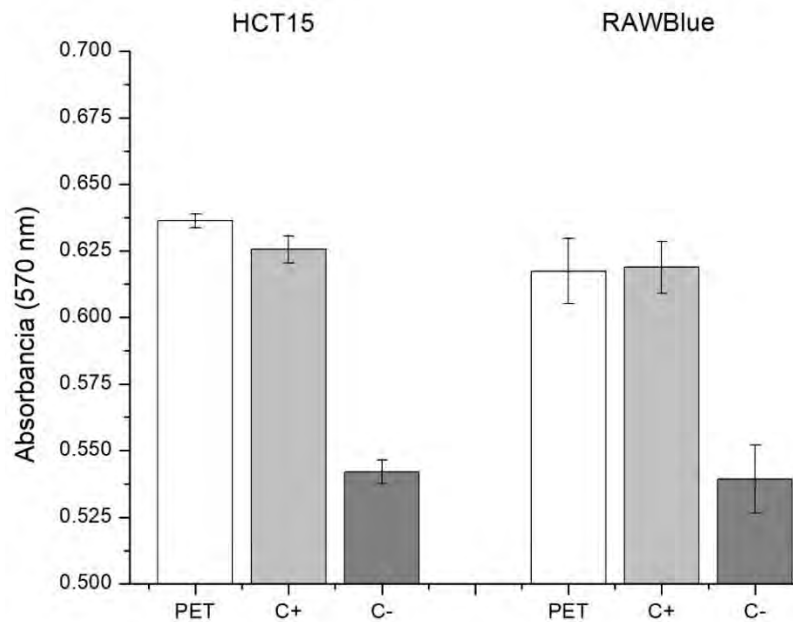


Figura 13. Análisis de viabilidad de las líneas celulares HCT15 y RAWBlue mediante un ensayo colorimétrico con AlamarBlue a 570nm. Podemos apreciar que no existen diferencias comparadas con las células sin estímulo (C+).

Utilizando estos resultados fue posible correlacionar la absorbancia con la curva de crecimiento celular de cada una de las líneas, para así determinar la cantidad de células vivas luego de 24 horas. En el caso de la línea HCT15 el porcentaje de viabilidad celular fue de 101% mientras que en la línea RAWBlue fue de 102%. Al analizar este resultado podemos decir que no existe un efecto citotóxico considerable en ninguna de las dos líneas celulares en presencia de la muestra SPET ya que existe una supervivencia prácticamente total.

7.5.2 Proliferación celular

Los resultados de este ensayo los podemos ver en la Figura 14, en la cual se presenta el porcentaje de reducción del reactivo alamarBlue, reducción de rezaursin a resultfurin, a 24, 48 y 72 horas en presencia de las líneas celulares HCT15 y RAWBlue respectivamente.

Al analizar los resultados podemos observar que los porcentajes de reducción del reactivo alamarBlue de las muestras en presencia de SPET con respecto al control de la línea celular HCT15 oscilan entre 80 y 135% de supervivencia, evidenciando que en los 3 días de incubación no existe ningún efecto citotóxico sobre las células. Este mismo resultado se

repite con la línea celular RAWBlue, sin embargo, es más evidente ya que los porcentajes de reducción del reactivo AlamarBlue oscilan entre 90 y 110%.

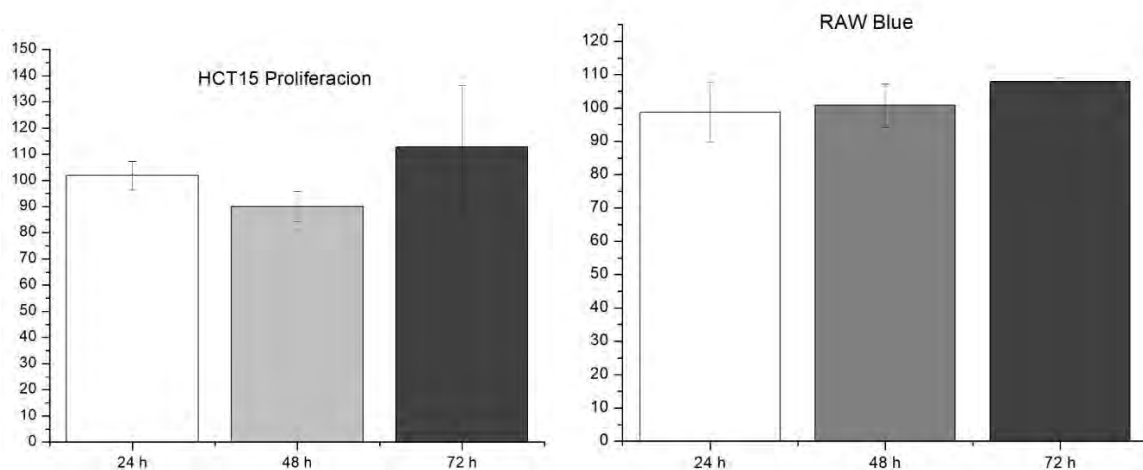


Figura 14. Porcentajes de proliferación celular de las líneas a) HCT15 y b) RAW Blue

7.5.3 Fagocitosis

Una de las funciones principales de los macrófagos, es el de internalizar cualquier cuerpo extraño para su eliminación. En los resultados que obtuvimos del análisis de fagocitosis (Figura 15) por medio de la prueba de Griess, pudimos determinar la producción de óxidos de nitrógeno de macrófagos cada 24 horas durante 3 días en presencia de la solución de NP's de PET.

Al analizar los resultados, se demostró la capacidad de la solución de nanopartículas de PET para estimular la producción de NO en cultivos de macrófagos RAW. Encontramos que cada 24 horas aumentaba la capacidad de estímulo de la producción de NO; sin embargo, la mayor producción se indujo a las 72 horas. Cabe destacar que, aunque nuestros resultados muestran que la actividad fagocítica de los macrófagos en presencia de PET aumenta con el tiempo; estas no parecen tener ningún efecto en su viabilidad ni en su proliferación.

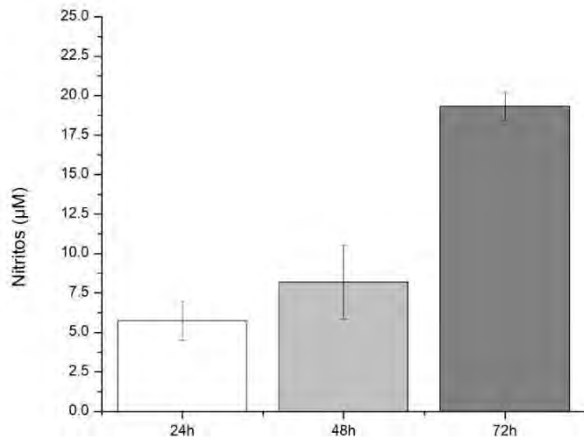


Figura 15. Análisis de producción de nitritos (NO_2^-) de macrófagos RAW ante la solución de PET ($10\mu\text{l}$)

7.5.4 Activación de macrófagos

Se realizó el análisis de la activación de macrófagos RAW Blue mediante la búsqueda de fosfatasa alcalina embrionaria secretada utilizando la prueba de QUANTI-Blue como se puede observar en la Figura 16.

Al analizar los resultados, se puede observar que nuestra solución de NP's de PET no logra despertar respuesta de los macrófagos RAW BLUE ya que los valores de absorbancia son similares a los obtenidos con el control (células sin estímulo) y con una marcada diferencia comparando ambas con nuestro control de lipopolisacáridos (LPS).

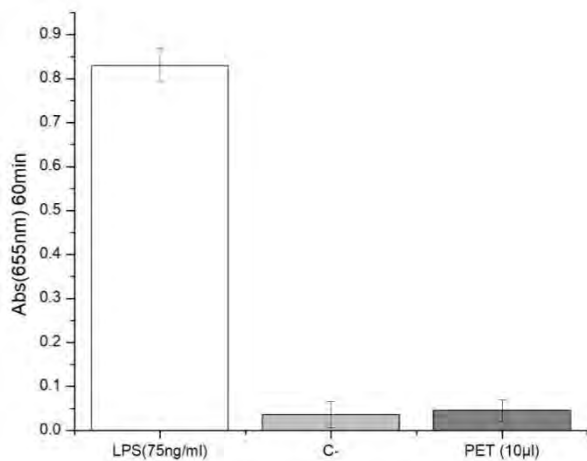


Figura 16. Respuesta inmune de macrófagos ante LPS y PET.

7.6 Microscopia de luz (*Contraste de fases*)

Una forma sencilla de analizar los efectos de las nanopartículas de PET en las células, es observando y comparando los cambios morfológicos en las células durante el tiempo que duró el ensayo. En las figuras 17 y 18, se presenta el seguimiento que se hizo a 24, 48 y 72 horas de las líneas celulares HCT15 y RAW Blue.

Como se puede observar en la figura 17, las células HCT15 a 24 horas en el caso del control, presentan ligeramente una mayor cantidad de puntos focales de adhesión en comparación con las que están en presencia de NP's de PET. También se destaca que las células con el control de DMSO están completamente esféricas, síntoma de alto estrés y defensa ante el medio.

Pasadas 48 horas las diferencias son más notorias, ya que las células control están completamente elongadas y con muchos puntos de adhesión focal mientras que las células con NP's de PET aún batallan por adherirse a la superficie de la placa. En las muestras con DMSO se observan restos de células necróticas, irregulares y muy pequeñas.

Luego de tres días no existe una diferencia notable entre las células control y las que se encuentran en presencia de NP's de PET. Ambas muestras llenan la placa, y muchas células presentan una gran cantidad de puntos focales de adhesión, se encuentran elongadas y con un gran tamaño comparadas con las células en presencia de DMSO las cuales se encuentra completamente destruidas, con una forma esférica o contienen varias vesículas características de la apoptosis.

En el caso de las RAW Blue (Figura 18) a las 24h en presencia de NP's de PET se observa una mayor cantidad de células elongadas y con puntos de adhesión focal (características de células sin perturbaciones) en comparación con las células control que aún no se anclan completamente a las placas debido a su forma circular. En las muestras con DMSO se pueden observar a las células pequeñas con comparación con las células anteriores y sin puntos de adhesión focal.

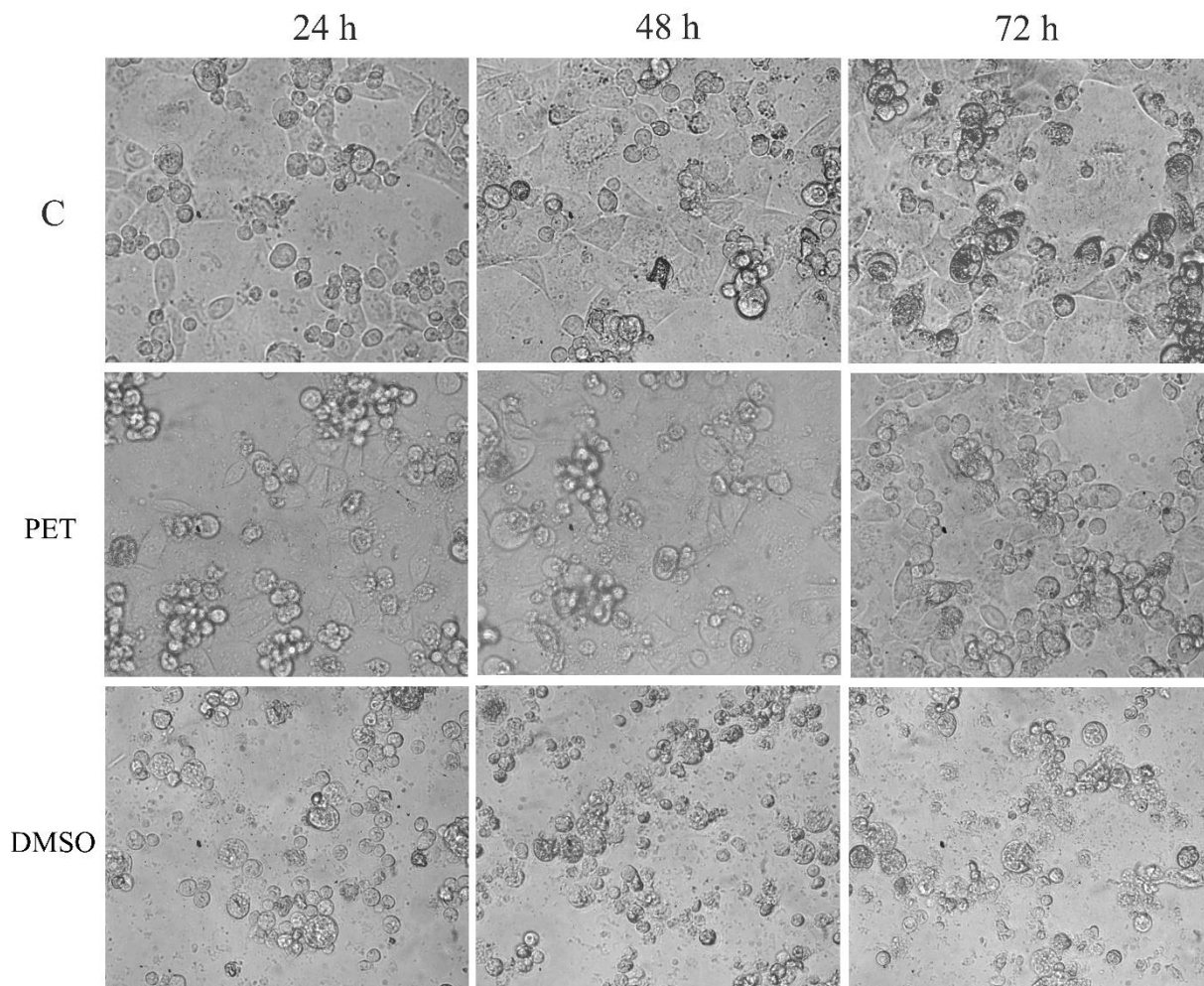


Figura 17. Micrografía por contraste de fases 40x de HCT15 cada 24 h por 3 días con diferentes medios.

Pasadas 48 horas no existe diferencia notable entre las células control y las que se encuentra en presencia de NP's de PET, por lo que no se encuentra ningún efecto morfológico. Caso contrario ocurre con las células en presencia de DMSO las cuales proliferan, pero se encuentran en mal estado pues tienen un tamaño pequeño, no tienen forma definida y se encuentran gran cantidad en estado necrótico.

A las 72 horas la diferencia entre las células control y las que se encuentran en presencia de NP's de PET es nula. Ambas muestras proliferaron saludablemente en comparación con las células en presencia de DMSO las cuales son pequeñas, tiene forma circular característica del estrés debido al medio y existen zonas con gran número de células en necrosis.

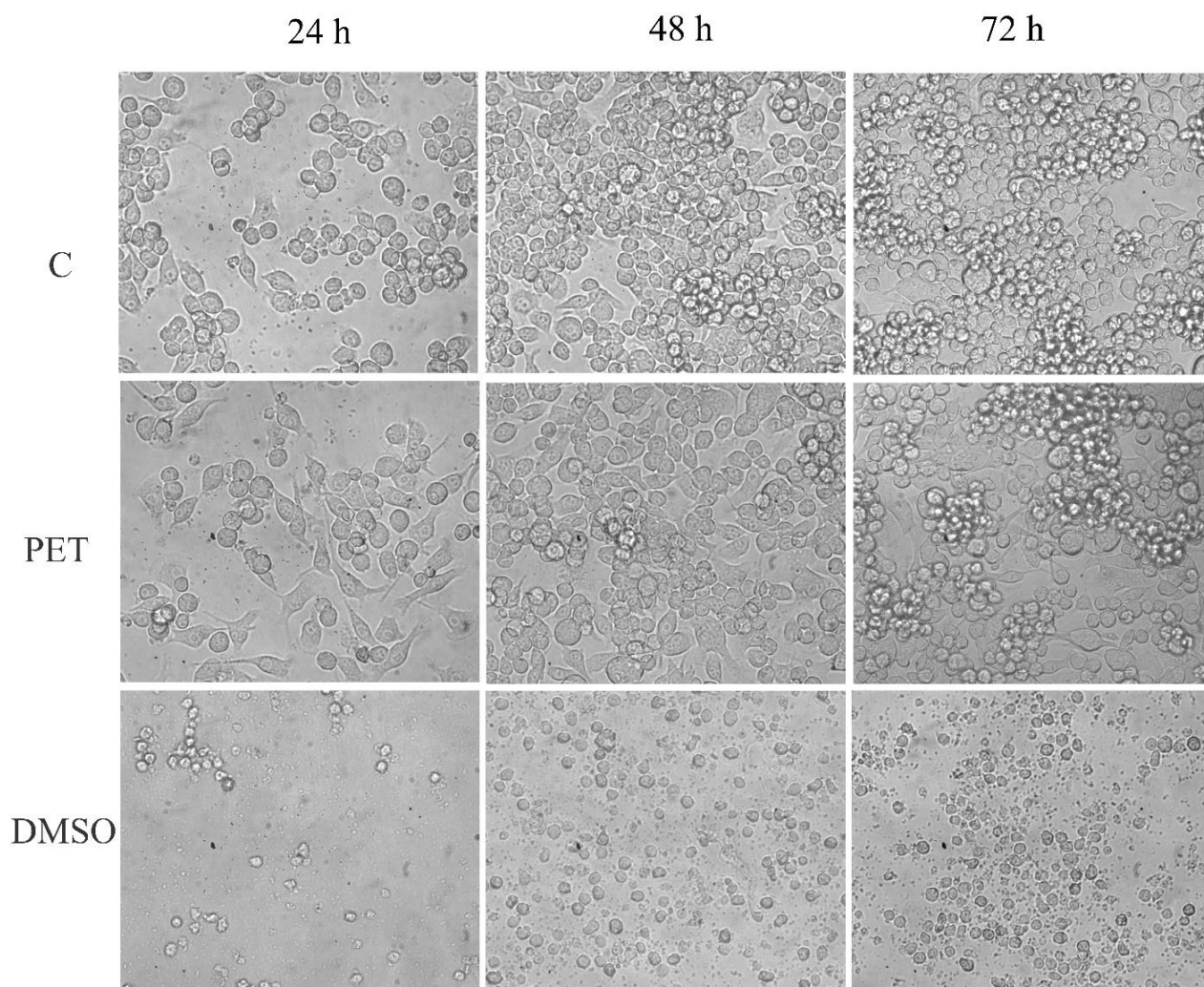


Figura 18. Micrografía por contraste de fases 40x de RAW Blue cada 24 h por 3 días con diferentes medios.

8. Conclusiones

En la actualidad la presencia de plásticos contaminantes en el ambiente, se ha convertido en un tema de gran importancia por el impacto ecológico y en la salud que estos puedan tener. Mucho se ha hablado de los microplásticos. Sin embargo, la formación de nanopartículas provenientes de la degradación del PET es algo totalmente inexplorado, ya que es difícil identificar la presencia de estas nanopartículas en los suelos o en ambientes como el acuático (marítimo y continental), por lo que con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir los siguientes puntos:

- Se demostró el efecto de la erosión natural que causa el mar y la arena en los objetos de PET, el cual puede degradar su superficie, produciendo micro y nanopartículas.
- Se comprobó la eficacia de la producción de NPs de PET mediante ablación láser, el cual permite controlar el tamaño (30-50 nm).
- Con esta técnica, se pudieron obtener nanopartículas únicamente de PET disueltas en agua sin la presencia de partículas provenientes del proceso de meteorización de la arena como producto de la interacción entre esta y las muestras de PET.
- Se determinó que estas nanopartículas de PET no presentan un efecto citotóxico aparente en las líneas celulares HCT15 y RAWBlue. Sin embargo, parecen tener un efecto en la proliferación de las células HCT15 a 48 horas, ya que se observó una disminución en los valores de absorbancia.
- Se observó un efecto en los procesos de interacción de los macrófagos en presencia de algún antígeno en función del tiempo, específicamente en los mecanismos de internalización o fagocitosis; ya que se observó un incremento en la producción de nitritos por estas células conforme el tiempo de interacción con las nanopartículas aumentaba, indicando una producción de NO.

9. Perspectivas

- Es necesario diseñar nuevos métodos de obtención y síntesis de NP's de PET para poder establecer otros parámetros de respuesta celular con macrófagos y células epiteliales de intestino como: dosis respuesta, concentración letal, así como la concentración efectiva e inhibitoria al 50% de la población celular.
- Es necesario realizar una caracterización completa de las nanopartículas de PET, para determinar sus propiedades físico-químicas comparados con el material PET, para poder sugerir posibles comportamientos dentro de la célula.
- Realizar un perfil proteo/génico de las células en contacto con las NP's de PET para monitorear posibles efectos a pequeño, mediano y largo plazo.
- Estudiar los mecanismos de internalización de las nanopartículas por macrófagos.
- Establecer los protocolos para el desarrollo de modelos *ex vivo*.
- Analizar el efecto toxicológico de las nanopartículas de plástico de PET en estos modelos *ex vivo*.

Bibliografia

- Barnes, D. K. A. (2002). Biodiversity Invasions by marine life on plastic debris. *Nature*, *416*(6883), 808–809. <https://doi.org/10.1038/416808a>
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, *566–567*, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041>
- E, R. A. (2004). Lost at sea: Where is all the plastic. *Science*, *304*(May), 838. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Steven_Rowland/publication/8575062_Lost_at_Sea_Where_Is_All_the_Plastic/links/0fcfd51001f3893f44000000/Lost-at-Sea-Where-Is-All-the-Plastic.pdf
- EPRO. (2015). Plastics - the facts 2014/2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticEurope*, 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.015>
- Hallion, R. P. (1982). Aerospace technology. <https://doi.org/10.1126/science.215.4529.155-a>
- Lopes Pires, M. E., Clarke, S. R., Marcondes, S., & Gibbins, J. M. (2017). Lipopolysaccharide potentiates platelet responses via toll-like receptor 4-stimulated Akt-Erk-PLA2 signalling. *PLoS ONE*, *12*(11), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186981>
- Masó, M., Garcés, E., Pagès, F., & Camp, J. (2003). Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. *Scientia Marina*, *67*(1), 107–111. <https://doi.org/10.3989/scimar.2003.67n1107>
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science and Technology*, *35*(2), 318–324. <https://doi.org/10.1021/es0010498>
- NCES. (n.d.). Polyethylene terephthalate (PET) production worldwide in 2014 and 2020 (in million metric tons). Retrieved from <https://www.statista.com/statistics/650191/global-polyethylene-terephthalate-production-outlook/>
- Pospíšil, J., Horák, Z., Kruliš, Z., & Nešpůrek, S. (1998). The Origin and Role of Structural Inhomogeneities and Impurities in Material Recycling of Plastics. *Macromolecular Symposia*, *135*, 247–263. <https://doi.org/10.1002/masy.19981350127>
- Rånby, B. (1989). Photodegradation and photo-oxidation of synthetic polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *15*(C), 237–247. [https://doi.org/10.1016/0165-2370\(89\)85037-5](https://doi.org/10.1016/0165-2370(89)85037-5)
- Rege, S. K., & Lakkad, S. C. (1983). Effect of salt water on mechanical properties of fibre reinforced plastics. *Fibre Science and Technology*. [https://doi.org/10.1016/0015-0568\(83\)90017-9](https://doi.org/10.1016/0015-0568(83)90017-9)
- Rodriguez, F. (2017). Plastic. Retrieved May 7, 2018, from <https://www.britannica.com/science/plastic>
- Singh, B., & Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, *93*(3), 561–584.

<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>

- Stallard, R. F. (1995). Tectonic, Environmental, and Human Aspects of Weathering and Erosion: A Global Review from a Steady-State Perspective. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 23(1), 11–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.23.1.11>
- The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2018). Polyethylene terephthalate. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/polyethylene-terephthalate>
- U.S. Drug and Food Administration. (2017). FDA’s Regulation of Pet Food. Retrieved from <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/ResourcesforYou/ucm047111.htm>
- Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schue, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.*, 84(2), 377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>
- Xie, W. H., Shiu, W. Y., & Mackay, D. (1997). A review of the effect of salts on the solubility of organic compounds in seawater. *Marine Environmental Research*, 44(4), 429–444. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00017-2)

Anexo

Anexo 1 CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR DE LAS LINEAS HCT15 Y RAWBLUE

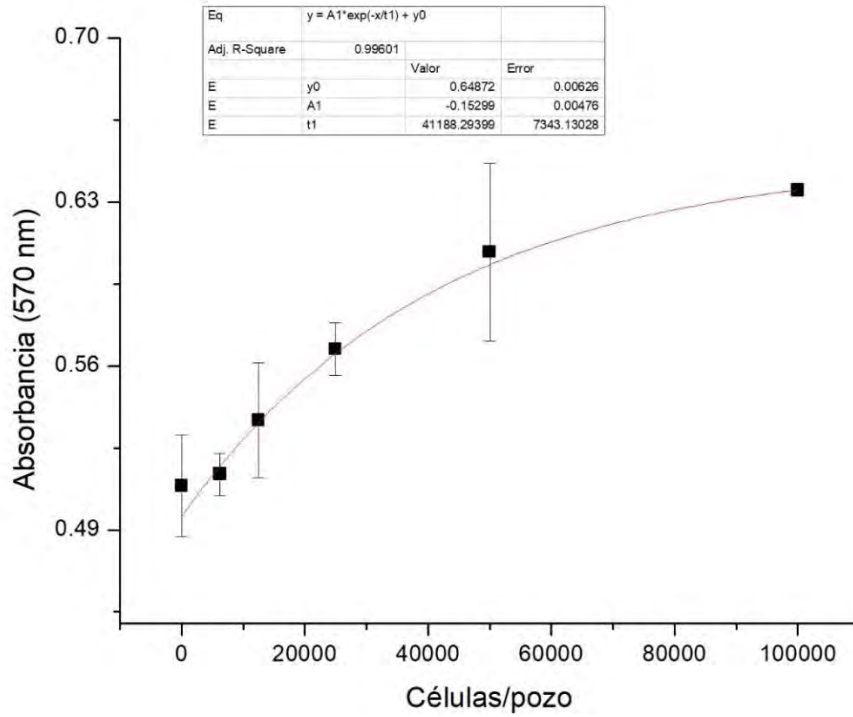


Figura 19. Curva estándar de concentraciones de la línea celular HCT15 a 24 horas

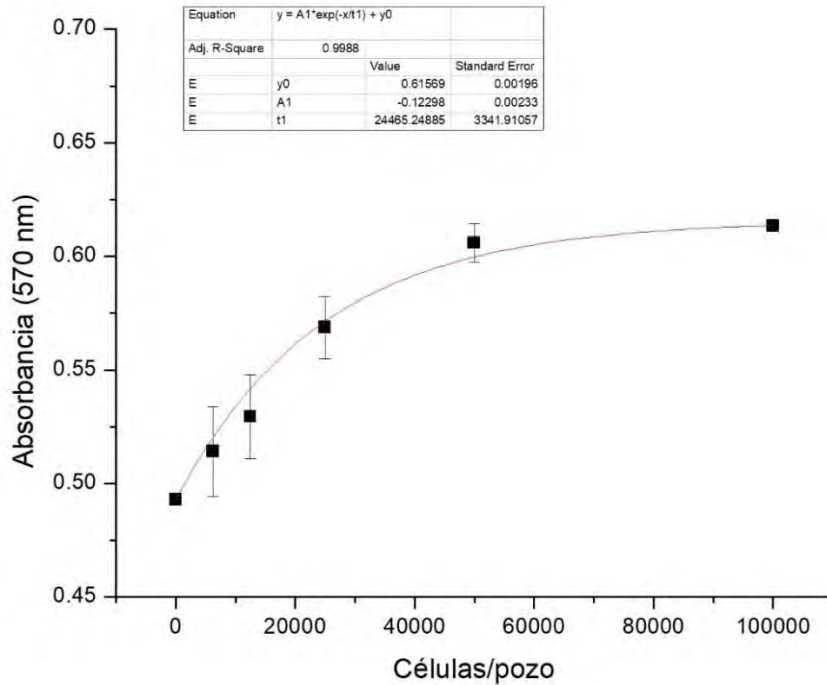


Figura 20. Curva estándar de concentraciones de la línea celular RAWBlue a 24 horas.

Índice de figuras y tablas

Tabla 1 Tipos de plástico y sus aplicaciones.....	9
Figura 1 Ejemplo de la ubicuidad del plástico en la corteza terrestre.....	11
Figura 2 Residuos de plástico en el borde de una playa en Filipinas.....	12
Figura 3 Representación esquemática del proceso de obtención de nanopartículas por ablación láser.....	16
Tabla 2 Mezclas de PET con diferentes soluciones	11
Figura 4 Esquema representativo del ensayo de viabilidad celular.....	19
Figura 5 Esquema representativo del ensayo de proliferación celular.....	20
Figura 6 Esquema representativo del ensayo de fagocitosis.....	21
Figura 7 Esquema representativo del ensayo de activación de receptores tipo Toll de macrófagos.....	22
Figura 8. Evidencia de la degradación causado por el oceano al PET.....	23
Figura 9. Análisis mediante FTIR.....	25
Figura 10. Análisis nanopartículas de PET sintetizadas por degradación de arena mediante MET.....	26
Figura 11 Análisis de SPET mediante MET.....	27
Figura 12. Distribución de partículas de la muestra SPET mediante DLS.....	28
Figura 13. Análisis de viabilidad de las líneas celulares HCT15 y RAWBlue).....	29
Figura 14. Porcentajes de proliferación celular de las líneas HCT15 y RAW Blue.....	30
Figura 15 Análisis de fagocitosis en macrófagos.....	31
Figura 16 Respuesta inmune de macrófagos ante LPS y PET.....	31
Figura 17. Micrografía por contraste de fases 40x de HCT15 cada 24 h por 3 días.....	33
Figura 18. Micrografía por contraste de fases 40x de RAW Blue cada 24 h por 3 días.....	34
Figura 19. Curva estándar de concentración de la línea celular HCT15.....	39
Figura 20. Curva estándar de concentraciones de la línea celular RAWBlue.....	39

Glosario de abreviaturas

DLS: Espectroscopia por luz dinámica

DMSO: Dimetilsulfoxido

FTIR: Espectrometría infrarroja

HCT15: Línea celular de adenocarcinoma de colon humano, Duke's tipo C

NED: Dihidrocloruro de N-1-naptoletilendiamina

NP's: Nanopartículas

MET: Microscopio electrónico de transmisión

RAWBlue: Línea celular derivada de macrófagos RAW264.7 de murinos con la integración cromosómica de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF- κ B y AP-1.

PET: Tereftalato de polietileno

SPET: Nanopartículas de tereftalato de polietileno sintetizados mediante ablación laser.