

Títol del treball:

**Avaluació ecotoxicològica de polímers i pintures
antiincrustants d'aplicació en vaixells.**

Nom estudiant: Francesc Isern Vilardell

Correu electrònic: francescisernvilardell@gmail.com

Grau en: Biologia

Nom del tutor: Ramon Moreno Amich

Correu electrònic: ramon.moreno@udg.edu

Non del cotutor* (en cas de places externes): Rubén Francisco Martínez López

Correu electrònic: rmartinez@leitat.org

Empresa / institució: LEITAT Technological Center

ÍNDEX

Resum.....	1
Resumen.....	2
Abstract	3
Reflexió ètica:.....	4
Reflexió sostenibilitat:	4
Reflexió de perspectiva de gènere:	4
1. INTRODUCCIÓ:	1
1.1. Problemàtica.....	1
1.2. Projecte NAUTILUS.....	2
2. OBJECTIVES:	5
3. METODOLOGIA:.....	5
3.1. Mostres.....	6
3.2. Lixiviació	6
3.3. Assaig ecotoxicològic en <i>Aliivibrio fischeri</i>	8
3.4. Assaig ecotoxicològic en <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	9
3.5. Assaig ecotoxicològic <i>Brachiounus plicatilis</i>	10
3.6. Assaig ecotoxicològic <i>Artemia franciscana</i>	10
3.7. Tractament de dades.....	11
3.7.1. Pre-tractament.....	11
3.7.2. ANOVA unidireccional	12
3.7.3. Gràfiques	13
4. RESULTATS:	13
4.1. Resultats pH i conductivitat.....	13
4.2. Resultats <i>A.fischeri</i>	14
4.3. Resultats <i>P.Tricornutum</i>	15
4.4. Resultats <i>B.Plicatilis</i>	16

4.5. Resultats <i>A.Franciscana</i>	16
4.6. Resultats diferències significatives ANOVA.....	18
4.7. Anàlisi integrat.....	19
5. DISCUSIÓ:	21
5.1. Polímers	21
5.2. Pintures	21
5.3. Filotoxicitat	22
5.4. Temps de lixiviació.....	23
5.5. Rellevància.....	23
5.6. Passes futures	23
6.CONCLUSIONS:	24
7.BIBLIOGRAFIA:	25

Resum

En aquest estudi s'han examinat els lixiviats de polímers i pintures antiincrustants per a ús marí per veure el seu potencial ecotoxicològic en diferents microorganismes. La recerca s'ha dut a terme dins del projecte Nautilus, en el qual diverses institucions treballen per investigar i desenvolupar noves pintures antiincrustants biobasedes i biodegradables.

Els microorganismes utilitzats són *Aliivibrio fischeri*, un bacteri bioluminescent; *Phaeodactylum tricornutum*, una alga diatomea; *Brachionus plicatilis*, un rotífer emprat en estudis ecològics i ambientals; i *Artèmia franciscana*, coneguda com a cloïssa de salmorra, que serveix com a model en assajos de toxicitat. Les mostres consisteixen en dos polímers, un d'acrílic i l'altre biobasat. A més, s'han examinat quatre mostres de pintures antiincrustants: dues formulacions que contenen biocides i polímers acrílics, i les altres dues sense biocides, una utilitzant el polímer acrílic i l'altra amb el biobasat.

Els lixiviats es van preparar en aigua de mar artificial (ASW) utilitzant una roda/sínia de laboratori i es van extreure en intervals de temps variats: 0 hores (immediatament després de la preparació), 24 hores, 72 hores i 7 dies després de la preparació. Per a l'obtenció dels materials, organismes i procediments, s'han utilitzat els següents kits: per a *Aliivibrio fischeri* WATERTOXTD (ISO11348-3), *Phaeodactylum tricornutum* ALGALTOXKIT M (ISO10253), *Brachionus plicatilis* ROTOXKIT M (ASTM E1440-91) i per a *Artemia franciscana* ARTOXKIT M (ASTM E1440-91).

Els resultats presenten diverses respostes biològiques mesurades en percentatges. Aquestes inclouen la inhibició de la bioluminescència en *Aliivibrio fischeri*, la taxa de creixement de *Phaeodactylum tricornutum* i les taxes de supervivència de *Brachionus plicatilis* i *Artèmia franciscana*. Els resultats obtinguts mostren que els polímers no són tòxics. Les mostres més tòxiques per a totes les espècies són les pintures antiincrustants que incorporin biocides, sent aquesta toxicitat principalment atribuïble als biocides i als metalls pesants com Cu, Zn i Fe. Les pintures que no contenen biocides també mostren toxicitat, però en nivells més baixos. La pintura antiincrustant sense biocida amb el polímer biobasat és més tòxica que la que conté un polímer acrílic i tampoc té biocida, a causa que al ser més biodegradable els elements tòxics es tornen més biodisponibles.

Resumen

En este estudio se examinan los lixiviados de polímeros y pinturas antiincrustantes para uso marino por su potencial ecotoxicológico en diferentes microorganismos. La investigación se llevó a cabo dentro del proyecto Nautilus, en el cual diversas instituciones colaboran en la investigación y desarrollo de nuevas pinturas antiincrustantes biobasadas y biodegradables.

Los microorganismos utilizados fueron *Aliivibrio fischeri*, una bacteria bioluminiscente; *Phaeodactylum tricornutum*, un alga diatomea; *Brachionus plicatilis*, un rotífero empleado en estudios ecológicos y ambientales; y *Artemia franciscana*, conocida como camarón de salmuera, utilizada como modelo en ensayos de toxicidad. Las muestras consistieron en dos polímeros, uno acrílico y otro biobasado. Además, se examinaron cuatro muestras de pinturas antiincrustantes: dos formulaciones que contienen biocidas y polímeros acrílicos, y las otras dos sin biocidas (una utilizando el polímero acrílico y la otra el biobasado).

Los lixiviados se prepararon en agua de mar artificial (ASW) utilizando una noria de laboratorio y se extrajeron en intervalos de tiempo variados: 0 horas (inmediatamente después de la preparación), 24 horas, 72 horas y 7 días después de la preparación. Para la obtención de los materiales, organismos y procedimientos, se utilizaron los siguientes kits: para *Aliivibrio fischeri* WATERTOXTSD (ISO11348-3), *Phaeodactylum tricornutum* ALGALTOXKIT M (ISO10253), *Brachionus plicatilis* ROTOXKIT M (ASTM E1440-91) y para *Artemia franciscana* ARTOXKIT M (ASTM E1440-91).

Los resultados presentan diversas respuestas biológicas medidas en porcentajes. Estas incluyen la inhibición de la bioluminiscencia en *Aliivibrio fischeri*, la tasa de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* y las tasas de supervivencia de *Brachionus plicatilis* y *Artemia franciscana*. Los resultados obtenidos muestran que los polímeros no son tóxicos. Las muestras más tóxicas para todas las especies son las pinturas antiincrustantes que contienen biocidas, siendo esta toxicidad principalmente atribuible a los biocidas y a metales pesados como Cu, Zn y Fe. Las pinturas que no contienen biocidas también muestran toxicidad, pero a niveles más bajos. La pintura antiincrustante sin biocida con el polímero biobasado es más tóxica que la pintura sin biocida con polímero acrílico debido que al ser más biodegradable, los elementos tóxicos se vuelven más biodisponibles.

Abstract

In this study, leachates from polymers and anti-fouling paints for marine use are examined for their ecotoxicological potential on different microorganisms. The research was done inside of the Nautilus project, in which different institutions work for researching and developing new biobased and biodegradable antifouling paints.

The microorganisms used are *Aliivibrio fischeri*, a bioluminescent bacterium; *Phaeodactylum tricornutum*, a diatom alga; *Brachionus plicatilis*, a rotifer also used in ecological and environmental studies; and *Artemia franciscana*, known as brine shrimp, which serves as a model in toxicity assays. The samples consist of two polymers, one acrylic and the other biobased. Additionally, the other four samples examined are antifouling paints: two formulations containing both biocides and acrylic polymers, and the last two not having biocides, with one using the acrylic polymer and the other having the biobased one.

The leachates were made in artificial seawater (ASW) using a laboratory rotary shaker and extracted at various time intervals: 0 hours (immediately after preparation), 24 hours, 72 hours and 7 days after being prepared. For the obtention of the material, organisms and procedures we used the following kits: for *Aliivibrio fischeri* WATERTOXTD (ISO11348-3), *Phaeodactylum tricornutum* ALGALTOXKIT M (ISO10253), *Brachionus plicatilis* ROTOXKIT M (ASTM E1440-91) and for *Artemia franciscana* ARTOXKIT M (ASTM E1440-91).

The results present diverse biological responses measured as percentages. These are inhibition of bioluminescence in *Aliivibrio fischeri*, the growth rate of *Phaeodactylum tricornutum*, and the survival rates for *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana*. The results obtained show that the polymers are not toxic. The most toxic samples across all the species are the antifouling paints that have incorporated biocides. This toxicity is mainly related to the biocides and the heavy metals such as Cu, Zn and Fe. The non-biocide containing paints also show toxicity but in lower levels. The biobased antifouling paint without biocide is more toxic than the non-biocide acrylic paint because being more biodegradable makes the toxic elements more bioavailable.

Reflexió ètica:

L'experimentació animal és una pràctica comuna en la investigació científica. Tot i els beneficis que ha comportat per la societat, la seva justificació ètica és un tema de debat, ja que els animals en aquestes pràctiques pateixen dolor, estrès i en molts casos la mort. Un exemple pot ser que per descobrir la insulina l'any 1921 es va induir la diabetis en gossos, aportant beneficis molt grans per la salut dels humans (Shin et al., 2015). La qüestió és si l'ús d'animals per beneficis humans és moralment acceptable malgrat el sofriment involucrat. Jo penso que l'experimentació animal és una eina necessària, però la comunitat científica té com a responsabilitat minimitzar-ne l'ús i castigar severament les males pràctiques d'aquesta. En el projecte que he treballat s'ha seguit la directiva europea 2010/63/UE, que promou la reducció d'animals utilitzats, refinar els procediments per minimitzar el patiment i reemplaçar amb alternatives no animals (*EUR-Lex - 02010L0063-20190626 - EN - EUR-Lex*, 2010).

Reflexió sostenibilitat:

Les pintures antiincrustants són essencials per el transport en l'indústria marina, ja que eviten les incrustacions d'organismes al casc reduint el consum de combustible i el cost del manteniment de les naus. Aquestes però també tenen efectes negatius com l'alliberació de residus tòxics pels organismes i el transport d'espècies a zones on no es troben de forma natural. Des d'aquest treball s'ha donat suport a una transició cap a pintures més sostenibles per garantir un futur en que el transport marítim sigui eficient i minimitzi l'impacte negatiu en l'ecosistema marí, d'aquesta forma es pot fer un desenvolupament econòmic que respecti el medi ambient.

Reflexió de perspectiva de gènere:

El reconeixement de les dones en el camp de la ciència és una lluita crucial per la justícia i igualtat en la investigació científica. Malgrat que les dones han tingut grans contribucions científiques al llarg de la història avui en dia encara segueixen estant estereotipades, subestimades i fins i tot ignorades. Segons un article del 2023 de la ONU diu que les dones només representen un 12% dels membres de les acadèmies nacionals de ciències, això mostra l'existència d'un sostre de vidre que impedeix o els sigui més difícil l'ascens a posicions de lideratge o d'alt nivell (*La Falta de Igualdad de Género En La Ciencia Nos Afecta a Todos | Naciones Unidas*, n.d.). Cal que la comunitat científica doni les mateixes oportunitats per a tothom perquè deixar de banda una part tant gran de la població alenteix la recerca de coneixement. A través de donar visibilitat i suport a les dones científiques es pot construir un futur on la ciència avanci en coneixement, inclusió i respecte.

1. INTRODUCCIÓ:

1.1. Problemàtica

A conseqüència dels seus grans beneficis per la societat, el plàstic ha esdevingut un material molt important, sent utilitzat en multitud de sectors com ara en l'empaquetament, la construcció, el transport, el tèxtil, l'electrònica, i la maquinària industrial entre d'altres (*Annual Global Plastic Waste Generation by Industrial Sector, 2019*, n.d.). En el transcurs de les darreres dècades, l'ús de plàstic ha augmentat de 2 milions de tones l'any 1950 a 367 milions el 2020, esdevenint un dels tipus de contaminació més importants actualment (Liu et al., 2022). Una gran part dels plàstics no abocats correctament arriben als oceans, provocant un augment de la seva presència al medi marí, generant un fort impacte, tant en forma de macro-, micro- i nano- plàstics. Segons l'ONU l'any 2021 més de 17 milions de tones de plàstic contaminaven els oceans; una xifra que creuen que es duplicarà per l'any 2040 (ODS, n.d.).

Es creu que el 80% d'aquests residus marins estan compostos per microplàstics (> 5 mm de diàmetre) i l'11% per microplàstics (< 5 mm). En tenir una gran variabilitat en les mides, els seus efectes nocius poden ser diversos (des d'afectacions físiques per bosses o anelles de plàstic fins a alliberament d'additius tòxics en el cas de partícules petites) i poden afectar a diferents nivells tròfics, des de productors primaris fins a depredadors (Wright et al., 2013). Conforme a estudis de Nacions Unides, s'ha observat que hi ha més de 220 espècies que ingereixen microplàstics en condicions naturals (*Los Microplásticos En El Pescado y Los Mariscos, ¿deberíamos Preocuparnos? | Noticias ONU*, n.d.).

La ingestió de plàstics pot tenir efectes tòxics sobre els organismes com la baixada de les reserves d'energia, canvis en el comportament a l'hora d'alimentar-se, en el moviment, creixement, i menys èxit en la cria entre d'altres. Addicionalment, alguns microplàstics poden traspasar membranes cel·lulars provocant toxicitat en les cèl·lules i en els teixits. Finalment, l'acumulament d'aquests en els éssers vius pot provocar la mort (*SOURCES, FATE AND EFFECTS OF MICROPLASTICS IN THE MARINE ENVIRONMENT: PART 2 OF A GLOBAL ASSESSMENT Science for Sustainable Oceans*, n.d.). Aquesta problemàtica, conjuntament al fet que la majoria dels plàstics d'origen fòssil (derivats del petroli) són resistent a la biodegradació i s'acumulen als ecosistemes, ha donat lloc a un augment en l'interès per la recerca i desenvolupament de polímers i plàstics biodegradables.

Una de les fonts d'alliberament de plàstic als oceans són les pintures antiincrustants dels vaixells, les quals eviten la incrustació sobre el casc de les naus de microorganismes, plantes i animals que es troben al medi marí. Les espècies que acostumen a incrustar-se són algues i invertebrats com, per exemple, mol·luscs, esponges, i anemones, entre altres... (Almeida et al., 2007)

Amb l'ús, les pintures s'alliberen al medi, deixant un rastre de microplàstics, en forma de polímers, i substàncies biocides, una de les principals responsables d'evitar aquesta incrustació d'organismes marins en ser tòxiques. L'ús de pintures antiincrustants cerca adreçar els problemes derivats de la mencionada incrustació com: augment de pes del vaixell, augment del consum de combustible degut a l'augment de resistència de l'aigua, disminució

de la velocitat, augment de costos de manteniment i introducció d'espècies en ecosistemes on no hi són presents de forma natural. S'estima, que el consum del combustible augmenta un 6% per cada 100 µm que incrementa d'incrustació en el casc (Arai et al., 2009).

S'ha demostrat que els biocides (molts dels quals tenen avui en dia com a principal component el Cu i el Zn) acaben perjudicant el medi marí, alliberant aquests metalls al medi. Tant el Cu com el Zn són metalls traça (micronutrients minerals), essencials i necessaris per a molts microorganismes, però que a partir d'unes determinades concentracions (per sobre del que és fisiològicament necessari) esdevenen tòxics (Karlsson et al., 2010).

Un altre aspecte negatiu relacionat amb l'alliberament d'aquestes pintures és la dificultat (o quasi impossibilitat considerant els costos associats) d'extreure els seus fragments del medi un cop són alliberats degut a la seva mida i gran dispersió per l'oceà (la seva alliberació al medi es considera intrínseca al seu ús). Aquest fet junt amb la seva difícil biodegradació provoca que estiguin molt temps presents en l'ambient perjudicant-lo.

1.2. Projecte NAUTILUS

Aquest treball s'ha integrat dins de la recerca desenvolupada a NAUTILUS, un projecte nacional de col·laboració públicoprivada (PCPP, referència CPP2021-008466) on diferents institucions tenen com a objectiu principal desenvolupar i estudiar el comportament de noves pintures antiincrustants biobasades i biodegradables. El projecte pretén avaluar tant el seu rendiment tècnic com el seu impacte ambiental (bio/degradació en entorns marins reals i ecotoxicitat).

L'objectiu final del projecte és la substitució de les pintures antiincrustants convencionals (d'origen fòssil i no biodegradables), per opcions més sostenibles de base biològica i biodegradables. Cal tenir en compte que es necessiten mantenir unes certes característiques tècniques essencials perquè aquestes continuïn sent útils.

Amb el projecte s'espera:

- a) Promoure polímers i recobriments antiincrustants que siguin respectuosos amb el medi marí.
- b) Comparar pintures biodegradables i de base biològica amb pintures convencionals que no ho són.
- c) Avaluar l'impacte de les pintures i la seva composició en el medi marí.
- d) Optimització de les proves de biodegradació marina a escala de laboratori complementades amb estudis de sistema obert.
- e) Entendre el patró d'alliberament de les pintures marines biodegradables i les no biodegradables.
- f) Anàlisi de replicabilitat i transferibilitat.

Els principals propòsits del NAUTILUS anteriorment mencionats s'organitzen en les següents tasques i activitats individuals:

- Desenvolupament de pintures antiincrustants de base biològica i biodegradables, incloent-hi una prova de concepte i de viabilitat d'aquests polímers per aplicacions en pintures.
 - 1- Desenvolupament de formulacions de nous biopolímers biodegradables per aplicacions marines.
 - 2- Formular noves pintures marines desenvolupades a partir dels biopolímers biodegradables del punt 1.
- Estudi de l'impacte i la biodegradació dels recobriments antiincrustants en el medi ambient, participant en una redirecció de l'ús cap a materials biodegradables i amb biocides de baixa toxicitat.
 - 3- Efectes i biodegradació de biopolímers i pintures en medi marí, a escala de laboratori.
 - 4- Aparició, destí i comportament de nanopartícules metàl·liques de les pintures antiincrustants.
 - 5- Proves de les noves pintures en medi marí natural.

Aquest treball està centrat en l'activitat 3, concretament en la tasca d'avaluar l'impacte de les pintures comercials i noves en la vida marina (ecotoxicitat). Des d'una de les empreses participants del projecte s'ha proporcionat tant pintures noves com comercials per fer-ne la comparació pel que fa a l'ecotoxicitat.

1.3. Avaluació de l'impacte de pintures comercials i noves en la vida marina

La informació sobre l'ecotoxicologia (o toxicitat ambiental) de diversos materials i compostos és necessària per a la seva comercialització a partir d'un determinat nivell de producció, es realitza mitjançant tests estàndard seguint guies definides per organismes acreditats (OECD -*Organisation for Economic Co-operation and Development*-; ISO -*International Organization for Standardization*-, o ASTM -*American Society for Testing and Materials*-, entre altres). Aquests tests es basen en l'exposició en diferents espècies model a un contaminant en condicions concretes en el laboratori. Encara que l'extrapolació a la realitat pot ser complexa, aquests tests ens permeten obtenir dades d'ecotoxicitat de forma clara, estandarditzada i amb unes condicions controlades.

Caixa de text I:

- **Espècie model:** organisme utilitzat en investigació científica per estudiar fenòmens biològics, toxicològics o per provar l'eficàcia de substàncies o tractaments. Solen ser fàcil la seva manipulació, reproducció i els seus processos biològics generals són representatius.
- **Espècie sentinella:** organisme utilitzat per determinar riscos o riscos ambientals mesurables per al benestar de l'ésser humà. Sol fer referència a les espècies utilitzades en camp que ja han estat accidentalment exposades a contaminants.

Quan les mostres/substàncies a testar són sòlids insolubles en el medi utilitzat per les exposicions (en el nostre cas, medi aquós salat) és comú utilitzar estratègies per condicionar-

les abans. Entre aquestes, es troba la lixiviació, la qual s'ha utilitzat en aquest treball. Per a més informació sobre aquest pretractament, juntament amb els tests comercials utilitzats i informació sobre les mostres, si us plau, adreceu-vos a l'apartat de metodologia (secció 3.1 i 3.2).

L'objectiu principal d'aquesta tasca en NAUTILUS (i treball principalment desenvolupat en el present TFG) és fer un estudi de l'impacte ecotoxicològic de les pintures en comunitats marines (espècies model provinents de diferents nivells tròfics i components clau de la cadena alimentària marina). Els nivells tròfics (i espècies en concret) en els que es realitzarà l'assaig són els següents:

	Phylum	Classe	Família
<i>Aliivibrio fischeri</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionaceae
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Phaeodactylaceae
<i>Brachionus plicatilis</i>	Rotifera	Eurotatoria	Brachionidae
<i>Artemia franciscana</i>	Arthropoda	Branchiopoda	Artemiidae

Taula 1: Taxonomia d'organismes utilitzats.

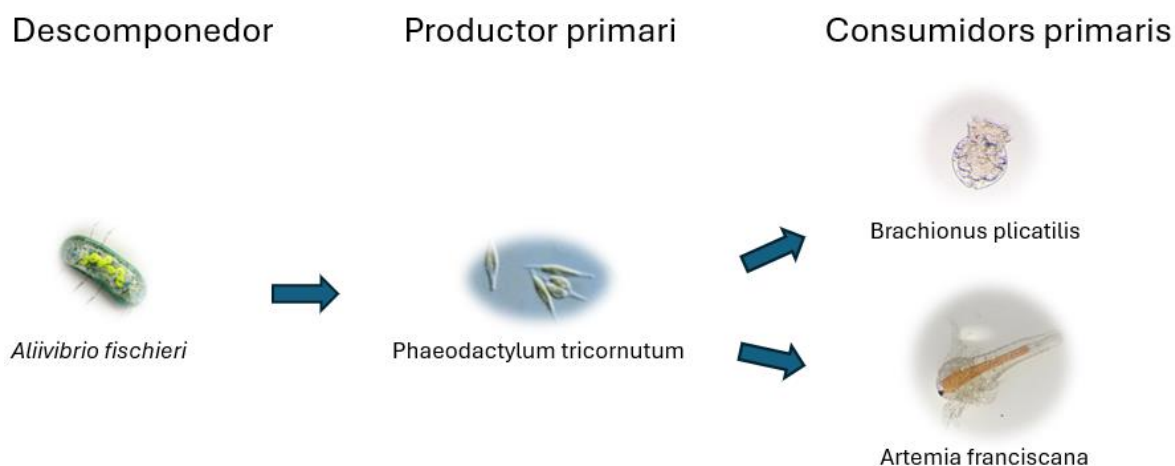


Figura 1: Esquema dels nivells tròfics dels organismes treballats.

1) L'*Aliivibrio fischeri* és un bacteri gramnegatiu bioluminescent. Es troba en ambients marins i té relació amb altres organismes, actuant com a espècie simbiòtica mutualista o com a patògen d'animals marins. En el treball s'utilitza com a representació del nivell tròfic dels descomponedors (Urbanczyk et al., 2007).

2) La *Phaeodactylum tricornutum* és un alga diatomea que es pot trobar en zones costaneres, en llocs com poden ser estuaris i en basses de marea. Aquesta alga és capaç d'adaptar-se a

ambients inestables. En aquest cas, s'utilitza en representació dels productors primaris (Martino et al., 2007).

3) El *Brachionus plicatilis* són uns rotífers, els quals, ecològicament, són uns membres importants en diversos habitats aquàtics en tots els continents. Són fàcils de cultivar, amb un creixement de la població ràpid, i resistent a variacions ambientals i a contaminants (Suatoni et al., 2006). En el present treball, s'utilitza com a representació del nivell tròfic dels consumidors primaris.

4) Encara que l'*Artèmia franciscana* no es trobi en estuaris o en el mar és una espècie eurihalina, és a dir, és capaç de viure en un ampli rang de concentració de sals. A més és una espècie model i sentinella, i es pot utilitzar tant per aigües costaneres com oceàniques (Riestra, n.d.). S'ha utilitzat, en conjunció amb el rotífer, com a representant dels consumidors primaris.

En conclusió, al projecte s'ha treballat per poder arribar a seleccionar la pintura antiincrustant més adequada per al medi ambient, utilitzant els resultats de cada pintura i polímer per comparar les noves opcions amb les convencionals (per a més informació, si us plau, adreceu-vos a l'apartat "2. Objectives").

2. OBJECTIVES:

The main objective of this work has been to evaluate the impact on the marine trophic network of conventional antifouling paints and new bio-based alternatives.

Within this objective, we aimed to:

- Compare the toxicity of the polymers to see if there is an improvement in terms of toxicity with the new biopolymer (PHA) compared to the standard polymer (ACR).
- Determine the source of the paint's toxicity by comparing the polymers. In this way, we observed whether the toxicity comes from the composition of the polymer or the presence of biocide.
- Compare acrylic paints to see the effects of the biocide.
- Conduct an ecotoxicological evaluation comparing acrylic paint and biopaint free of biocide. In this way, we observed if there is a safety improvement with the biopaint.

3. METODOLOGIA:

Els tests es faran exposant les espècies anteriorment mencionades a aigües exposades prèviament als polímers i a les pintures antiincrustants. Les aigües s'obtidran a través d'un procés de lixiviació, fent servir aigua de mar artificial (vegeu secció 3.2 per a més informació). Per poder estudiar els efectes tòxics de l'alliberació progressiva de substàncies des de les mostres cap al medi aquós, els tests s'han fet amb aigües exposades a les mostres durant diferents temps. Els tests estàndard s'han dut a terme mitjançant tests de toxicitat aquàtics comercials (un ECotest (WATERTOX-STD) i tres TOXKITS (ALAGALTOSKIT-M,

ROTOXKIT-M, ASTOXKIT-M)) l'eficàcia dels quals s'ha provat per testar la toxicitat de químics o efluents que s'alliberen tant en aigua dolça, estuaris o ambients marins.

3.1. Mostres

S'ha treballat amb diferents tipus de pintures i polímers:

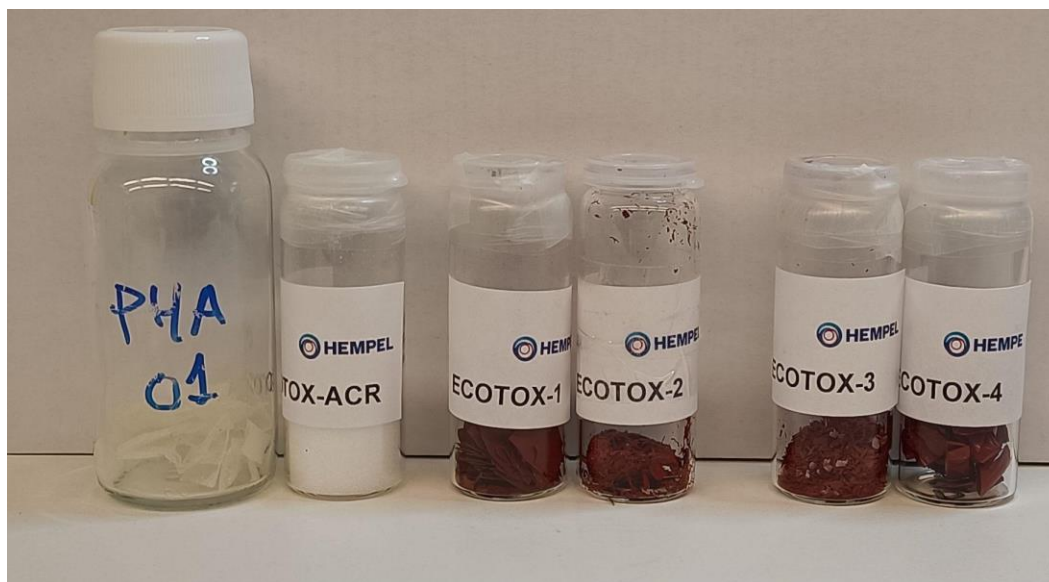


Figura 2: Mostres d'esquerra a dreta de polímers, PHA i ACR, i de pintures E1, E2, E3 i E4. El contingut d'aquestes es mostra en la taula 2. Foto: font pròpia.

MOSTRA	CONTINGUT
ACR	Polímer acrílic, pot tenir restes de monòmers.
PHA	Nou biopolímers, basat en polihidroxialcanoats.
Ecotox1	Metalls: Cu, Zn, Fe.
	Biocides: Cu_2O , Piritiona de coure.
	Altres: Colofònia, polímer acrílic.
Ecotox2	Metalls: Fe.
	Biocides: DCOIT.
	Altres: Polímer acrílic, polímer PDMS/PEG, dibenzoat de dipropilenglicol.
Ecotox3	Metalls: Fe.
	Altres: Polímer acrílic, polímer PDMS/PEG, dibenzoat de dipropilenglicol.
Ecotox4	Metalls: Fe
	Altres: PHA, polímer PDMS/PEG, dibenzoat de dipropilenglicol.

Taula 2: Mostres i contingut de pintures i polímers.

3.2. Lixiviació

La lixiviació és un procés per al qual s'extreuen substàncies des d'una matriu/mostra sòlida (en aquest cas de les pintures i polímers), cap a un medi líquid (extractant) mitjançant el

contacte d'ambdós durant un temps determinat. Aquests químics extrets passen a estar en solució (o dispersió) en l'extractant.

En el present estudi, per realitzar la lixiviació de les nostres mostres s'ha fet servir un medi aquós salat que simula l'aigua de mar (artificial seawater o ASW) per dues raons: a) simular l'alliberament de les substàncies en un entorn el més semblant possible al real, però amb una composició controlada, i b) obtenir el lixiviat directament en el medi en el qual viuen els organismes model a testar (sense cap classe d'extracció intermèdia).

En la taula 3 s'observa la composició de sals de l'aigua de mar artificial (ASW). L'aigua utilitzada per fer aquesta solució és aigua MilliQ, la qual s'obté per filtració d'aigua desionitzada i és emprada degut a la seva puresa, per evitar qualsevol mena de contaminació química o biològica.

Medi	Composició
Artificial seawater (ASW)	26,4 g/L NaCl
	0,84 g/L KCl
	1,67 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	4,6 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	5,58 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,170 g/L NaHCO_3
	0,03 g/L H_3BO_3

Taula 3: Composició d'ASW.

El procés s'ha realitzat utilitzant una sènia/roda d'agitació rotatòria com es pot observar en la Figura 3.

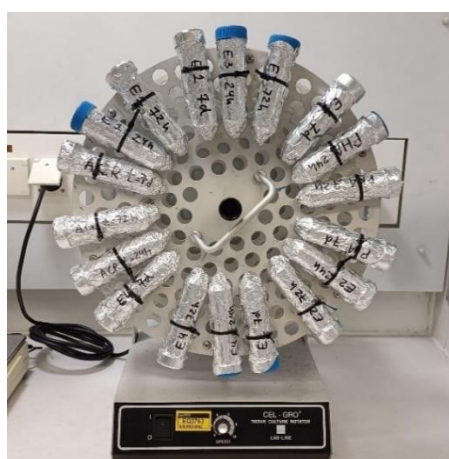


Figura 3: Sènia d'agitació rotatòria. Foto: Font pròpia.

Aquesta s'ha emprat amb les següents condicions de treball: velocitat de 10 rpm, temperatura de 20 °C i en foscor (evitant el contacte de la llum amb els materials, com es pot observar a la imatge, ja que pot afectar en la degradació). S'han utilitzat Falcons de plàstic de 50 ml que contenen l'ASW i la mostra en una concentració de 10 g/L, amb un volum total de 30 mL

(cadascú). Aquesta s'ha escollit a través de recerca bibliogràfica, utilitzant un estudi com a referència a causa de la seva similitud (Almeda et al., 2023a). El temps de contacte en la roda entre el medi i les mostres va ser de 0, 24, 72 hores i una setmana (7d), per poder estudiar els efectes tòxics de la lixiviació (alliberació) progressiva, amb el temps, de micro/nanoplàstics, biocides i altres additius de les mostres al medi, esperant una major toxicitat a major temps de lixiviació.

Després de l'extracció de cada temps (0 h, 24 h, 72 h, i 7 d) es du a terme una filtració del lixiviat amb filtres Whatman GF/F de mida de porus de 0,7 µm. Amb aquesta mida de porus, es permet que els microplàstics no quedin en els lixiviats, però si les substàncies que han alliberat (Almeda et al., 2023a). Per finalitzar, cada lixiviat es va guardar a una temperatura de -20 °C en la foscor fins al dia de l'exposició als organismes model.

3.3. Assaig ecotoxicològic en *Aliivibrio fischeri*

En aquest assaig s'ha utilitzat el kit comercial WATERTOXTD i seguint l'ISO 11348-3. El kit ja ve equipat per poder realitzar l'assaig, incloent-hi també vials amb *Aliivibrio fischeri*. En aquest assaig es mesura la inhibició de bioluminescència, ja que és un indicador del correcte funcionament del metabolisme del bacteri perquè està relacionada amb la cadena de transport d'electrons. La bioluminescència està regulada per l'operó *lux*, el qual s'indueix a través dels mecanismes de comunicació intercel·lulars, *quorum sensing*. Degut al *quorum sensing* s'involucra el gen *luxI* el qual codifica per una molècula autoinductora que activa l'operó *lux*. Per tant, que hi hagi una densitat cel·lular òptima és un requisit per transcriure l'operó *lux* i conseqüentment hi hagi bioluminescència. Si hi ha presència d'un tòxic que afecta el metabolisme pot produir menys densitat cel·lular i, com a conseqüència, menys quorum sensing i bioluminescència.

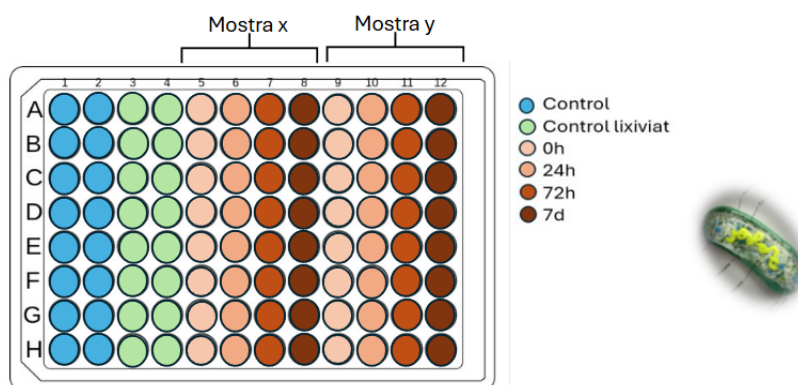


Figura 4: Organització de les plaques d'*Aliivibrio fischeri*. Placa de 96 pouets, a la part superior de la figura s'observa dues claus fent referència al fet que en els pouets s'hi ha introduït una mostra de polímer/pintura diferent. En la part superior a la dreta hi ha la llegenda que indica els colors dels controls i temps de lixiviat introduït en cada pouet. En la part superior a la dreta hi ha la llegenda que indica els colors dels controls i temps de lixiviat introduït en cada pouet, Foto: (*Vibrio Fischeri Bacterium* by Trilobiteglassworks on DeviantArt, n.d.).

El protocol que s'ha seguit és el següent, amb lleugeres modificacions: Com a resum: s'ha reconstituït l'*Aliivibrio fischeri*, ja que està liofilitzat, durant un període de 30 min a 4 °C. Seguidament, s'ha afegit en cada pouet de la placa 40 µL de medi ASW i 0,8 µL de estoc de bacteris, incubant-los a la mateixa temperatura durant uns altres 15 minuts. Després d'aquesta incubació, s'han afegit 125 µL de lixiviat per pouet (seguint l'esquema de la figura

4) i s'ha fet la mesura de la luminescència inicial (I_0) utilitzant el lector *Infinite Mnano 200 PRO* (TECAN). Finalment, s'han incubat les plaques durant 30 minuts i s'ha realitzat la lectura de la luminescència final (I_t) (*WATERTOX-STD* | Ecotest, n.d.).

En aquest cas, s'han realitzat 3 plaques amb 8 rèpliques de cada condició (mostra i temps de lixiviat) cadascuna (excepte per al control de medi i de control de lixiviat, per als quals hi havia 16 rèpliques). En cada placa s'han dipositat 8 condicions en total (els 4 temps de lixiviació de 2 mostres).

3.4. Assaig ecotoxicològic en *Phaeodactylum tricornutum*

Aquest assaig s'ha realitzat utilitzant el kit ALGALTOXKIT M i seguint l'ISO 10253. Aquest kit ja ve equipat per tal de poder fer l'assaig incloent l'alga *Phaeodactylum tricornutum*, conservada en una nevera (5 ± 2 °C) en condicions de foscors fins al seu ús.

El protocol que s'ha seguit és el següent, amb lleugeres modificacions: (Marine Toxicity Test with Microalgae STANDARD OPERATING PROCEDURE, n.d.) Com a resum: El primer pas ha estat preparar 2 L del medi on es cultiva l'alga (ASW mencionat anteriorment a la Taula 2). Posteriorment, s'ha procedit a fer un precultiu de l'alga, transferint 7,5 mL d'ASW en el tub d'inòcul d'alga que ve amb l'ALGALTOXKIT M, s'ha homogeneïtzat i transferit a la cel·la de precultiu on s'ha incubat tres dies a una temperatura de 20 ± 2 °C, amb il·luminació constant d'entre uns 3000-4000 lux per la part inferior i 10000 lux d'il·luminació lateral (Marine Toxicity Test with Microalgae STANDARD OPERATING PROCEDURE, n.d.). Un cop acabat el precultiu, es va determinar la concentració d'alga mitjançant una càmera de Neubauer i el microscopi BH-2 (Olympus). Partint d'aquí, s'ha calculat que en cada pouet havia de tenir 178 µL de lixiviat i 22 µL d'alga per aconseguir una concentració final d'alga de: 10^4 cèl·lules/ml.

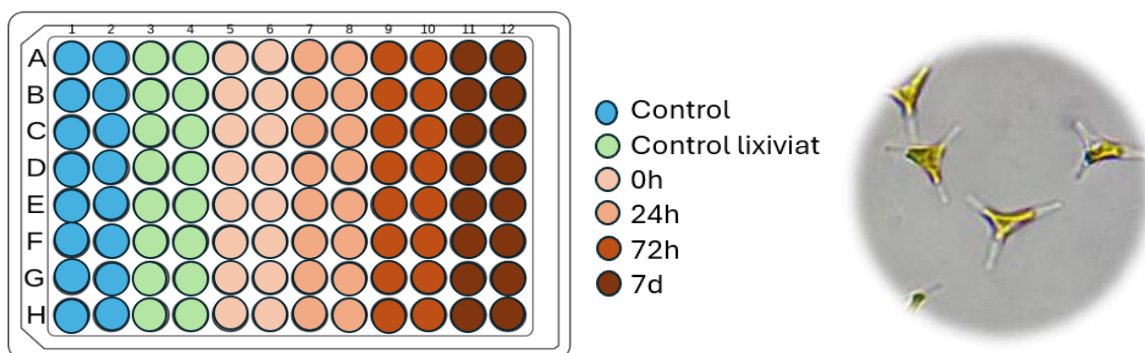


Figura 5: Organització de la placa de *Phaeodactylum tricornutum*. Placa de 96 pouets, en la llegenda situada a la dreta s'indica els colors dels controls i temps de lixiviats introduïts en cada pouet. FOTO: (Our "Love Letter to *Phaeodactylum Tricornutum*" - Aquaholic Aquaculture, n.d.).

Es va realitzar una recta patró per tal de determinar la concentració de cèl·lules que corresponia amb diferents absorbàncies. Les diferents dilucions d'alga en la recta varen ser del 100, 50, 25, 12,5, 6,25 i 0%, considerant que el 100% corresponia a una concentració d'alga de $x \cdot 10^4$ cèl·lules/ml.

Cada placa tenia 16 rèpliques per cada condició (temps de lixiviat i mostra), i s'ha emprat una placa per mostra. En aquest cas, les plaques s'han incubat en condicions de foscors a 20 ± 2

°C i es realitzaren lectures d'absorbància a 670 nm de longitud d'ona a 0, 24, 48 i 72 hores mitjançant l'anterior lector ja mencionat (*Infinite Mnano 200 PRO* (TECAN)).

3.5. Assaig ecotoxicològic *Brachionus plicatilis*

Per fer aquest assaig s'ha utilitzat el kit ROTOXKIT M el qual ja ve preparat per fer assaigs de toxicitat amb el rotífer *Brachionus plicatilis*, seguint la guia estàndard ASTM E1440-91.

El protocol que s'ha seguit és el següent, amb lleugeres modificacions: (Rotifer Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Waters STANDARD OPERATING PROCEDURE, n.d.). Com a resum: s'ha fet eclosió dels *Brachionus plicatilis* en forma dorment, transferint-los a una placa de petri on hi havia una dissolució del medi ASW (5,7 mL d'ASW amb 4,3 d'aigua destil·lada), aconseguint una salinitat reduïda de 20 ppt, la indicada en el kit. La placa s'ha incubat a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durant 48 hores amb una il·luminació continua de 3000-4000 lux. Després de la incubació, 50 rotífers s'han transferit a cada pouet de rentat des d'on s'han dipositat 5 a cada pouet d'assaig, els quals contenen els lixiviats (veure figura 6 per a més informació sobre l'organització de les plaques). S'han incubat les plaques a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la foscor durant 24 hores i s'ha mesurat el nombre d'individus vius per pouet utilitzant l'estereomicroscopi binocular SMZ-161 (MOTIC). Per aquest assaig, considerant el disseny de placa, s'han fet 5 rèpliques de cada polímer/pintura (5 plaques coincidents).

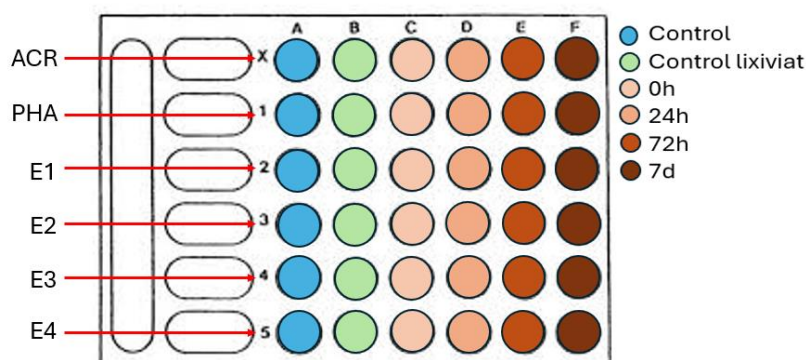


Figura 6: Organització placa de *Brachionus plicatilis*. Placa de 6 pouets de rentatge i 36 pouets d'assaig, en els pouets de rentatge s'ha introduït 0,7 mL d'ASW i en els d'assaig 0,3 mL. A l'esquerra de la figura s'indica amb una fletxa de quina mostra són els lixiviats que s'ha introduït en cada fila de la placa. En la llegenda situada a la part dreta de la figura s'indica els colors dels controls i temps de lixiviat introduïts en cada pouet. A la dreta de la figura hi ha una fotografia d'un exemplar de *Brachionus plicatilis*, feta amb el microscopi Olympus BH-2. Foto: font pròpia.

3.6. Assaig ecotoxicològic *Artemia franciscana*

Per fer aquest assaig s'ha utilitzat el kit ARTOXKIT M el qual ja ve preparat per fer assaigs de toxicitat amb *Artèmia Franciscana* seguint la guia estàndard ASTM E1440-91.

El protocol que s'ha seguit és el següent, amb lleugeres modificacions: (Artemia Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Waters STANDARD OPERATING PROCEDURE, n.d.) Com a resum: s'ha realitzat l'eclosió dels ous dorments d'*Artèmia franciscana* transferint-los a una placa amb 10 ml d'ASW i incubant-los 30 hores a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, amb una il·luminació

d'entre 3000-4000 lux. Posteriorment, s'han omplert les plaques de 24 pouets de l'assaig amb els lixiviat (cada pouet conté 1 ml) i s'han transferit les larves d'*Artèmia franciscana* utilitzant una micropipeta (10 a cada pouet). Cada condició (temps de lixiviat i mostra) consta de 4 replicats, utilitzant una placa per a cada mostra (adreçar-se a la figura 7 per a més informació sobre l'organització de la placa).

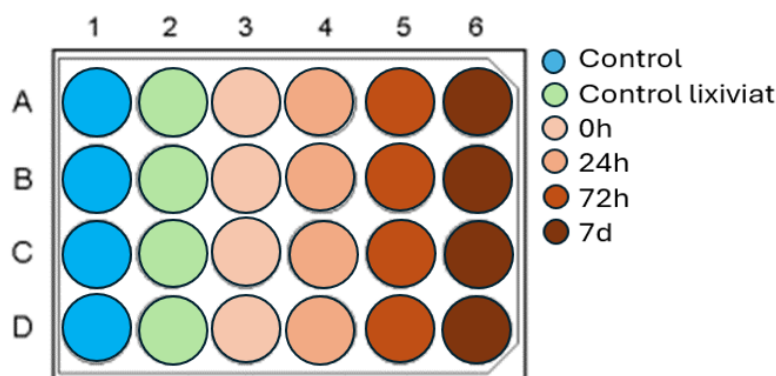


Figura 7: Organització placa d'*Artèmia franciscana*. Placa de 24 pouets, en la llegenda situada a la dreta s'indica els colors dels controls i temps de lixiviat introduïts en cada pouet. A la dreta de la imatge hi ha una fotografia d'un exemplar d'*Artèmia franciscana*, feta amb el microscopi Olympus BH-2. Foto: font pròpia.

Un cop feta la transferència s'ha tapat amb un parafilm i s'ha iniciat l'exposició durant 48 hores a 25 ± 2 °C en la foscor. Tant a 24h com a 48h d'exposició s'ha mesurat la mortalitat utilitzant l'estereomicroscopi binocular SMZ-161 (MOTIC).

3.7. Tractament de dades

3.7.1. Pre-tractament

L'anàlisi de dades ha estat diferent segons l'espècie, ja que s'han obtingut en formats diferents.

Les dades obtingudes de l'*A.fischeri* són en valor de bioluminescència (arbitrari, AU, per les seves sigles en anglès). S'han calculat els valors de percentatge d'inhibició de bioluminescència (INH%) amb la següent fórmula, obtinguda del kit WATERTOXTD.

$$INH\% = 100 - 100 \left[\frac{IT_t}{(KF \cdot IT_0)} \right] \quad KF = \frac{IC_T}{IC_0}$$

- KF= factor de correcció
- $IC_T IC_0$ = Luminescència del control a temps 0.
- IC_T = Luminescència del control després de 30 min.
- IT_0 = Luminescència de la mostra a temps 0.
- IT_T = Luminescència de la mostra després de 30 min.

Els valors obtinguts de *P.tricornutum* són d'absorbància. Primer amb la càmera de Neubauer s'ha comptat que al 100% de la concentració d'alga hi ha 10^4 cèl·lules/mL, a partir d'aquesta

data i els valors d'absorbància obtinguts en les diferents mesures s'ha realitzat una recta patró utilitzant Excel.

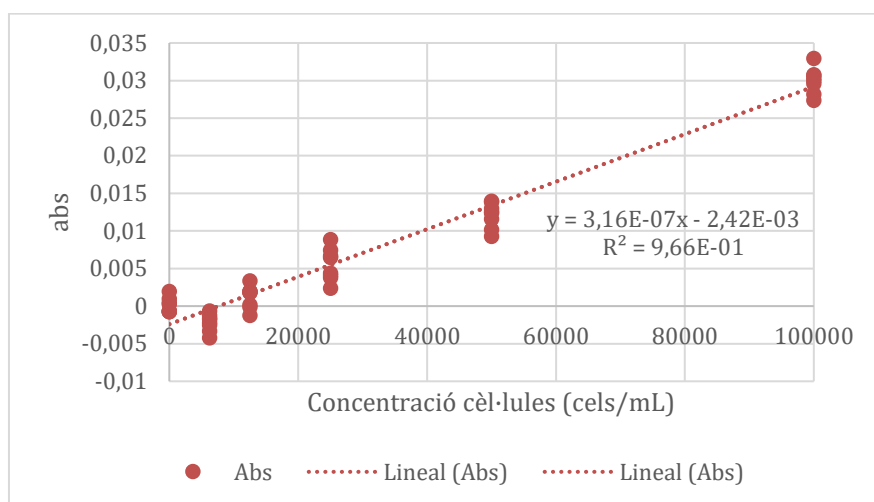


Figura 8: Recta patró feta a través de les dades d'absorbància de l'organisme *Phaeodactylum tricornutum*. A la dreta de la recta hi ha l'equació i la R^2 corresponent. Com es pot observar, la recta patró posseeix una R^2 acceptable (0.966) així que s'ha utilitzat per calcular la concentració d'alga a les mostres.

Després s'ha fet una correcció de fons de l'absorbància obtinguda per cada pouet. Un cop feta la correcció, s'ha utilitzat l'equació de la recta patró per calcular la concentració d'alga diatomea (cèl·lules/mL) a cada pouet. Finalment, s'ha calculat la taxa de creixement segons la OECD201.

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dies}^{-1})$$

- μ_{i-j} = taxa de creixement del temps i (0 h, t_i) al j (72 h t_j).
- X_j = absorbància a 72 h.
- X_i = absorbància a 0 h.

Finalment, s'ha volgut calcular la inhibició de creixement per poder fer una millor representació de les dades. S'han normalitzat les taxes de creixement respecte al grup control (creixement grup control = 100%) i posteriorment s'ha calculat la diferència respecte a aquest grup per a cadascuna (inhibició de creixement del grup control = 0%).

En el cas de l'*A. franciscana* i *B. plicatilis* s'ha obtingut la supervivència de cada pouet, i a partir d'aquí s'ha calculat en forma de percentatge.

$$\% = \frac{n^{\circ} \text{ de supervivents del pouet} \cdot 100}{n^{\circ} \text{ d'organismes totals en el pouet}}$$

3.7.2. ANOVA unidireccional

En tots els casos (els valors obtinguts pels 4 organismes model), s'ha utilitzat el programa GraphPad Prism versió 10.2.3 per identificar els "outliers" descartant els valors anormals que poden ser provocats per errors experimentals, de lectura, etc. Amb les dades sense "outliers"

de cada organisme s'ha realitzat una ANOVA unidireccional i una anàlisi post-hoc (Tukey test) per comparar els valors de cada condició (temps de lixiviat i mostra) per determinar l'existència de diferències significatives entre les mitjanes de tots els grups (grup control inclòs).

3.7.3. Gràfiques

Per la realització dels gràfics de barres que es mostren en l'apartat de resultats (apartats 4.2./4.3./4.4./4.5.), s'ha utilitzat el programa Graphpad Prism versió 10.2.3. Per fer els gràfics s'ha utilitzat les dades de cada organisme sense "outliers" obtingudes al fer l'ANOVA unidireccional (apartat 3.7.2.).

Utilitzant el programa RStudio versió 2023.12.1 s'ha fet les gràfiques del PCA i heatmap (apartat 4.7) mitjançant els paquets *pheatmap* i *ggplot2*. Per poder fer aquesta anàlisi s'han reduït els diferents replicats de les diverses espècies a 4 (excepte *A. Franciscana*, la qual ja tenia 4) mitjançant mitjanes aconseguint d'aquesta forma el mateix nombre de rèpliques (quatre) per espècie.

4. RESULTATS:

4.1. Resultats pH i conductivitat

		pH	Conductivitat (mS/cm)
Control medi		7,65	46,5
Control lixiviat		7,63	47,4
ACR	0h	7,93	43,3
	24h	7,70	46,9
	72h	7,85	32,7
	7d	7,82	46,0
PHA	0h	7,98	40,0
	24h	7,81	43,0
	72h	8,24	40,3
	7d	7,88	44,2
E1	0h	7,87	37,1
	24h	7,85	43,7
	72h	8,04	46,9
	7d	8,13	46,7
E2	0h	7,78	39,2
	24h	7,75	42,8
	72h	7,65	36,0
	7d	7,63	45,9
E3	0h	7,74	40,0
	24h	7,87	45,3
	72h	7,61	44,8
	7d	7,70	46,1
E4	0h	7,91	40,7
	24h	7,63	40,4
	72h	7,69	46,9
	7d	7,72	47,3

Taula 4: Taula amb mesures de pH i conductivitat dels llixiviats de les mostres a diferents temps i dels controls.

S'ha mesurat el pH i la conductivitat amb el pH-metre/conductímetre Sension+ MM374 (Hatch Lange), per tal d'assegurar que les condicions són òptimes per als organismes model, que la variabilitat dels resultats no hagi estat influenciada per aquests paràmetres, i alguna possible influència del procés de llixiviació. L'ASW utilitzada per simular les condicions de l'aigua de mar natural (grups control i control de llixiviats) ha d'estar en un pH entre 7,5 i 8,3, respecte a la conductivitat ha de ser entre 40 i 55 mS/cm. Es pot observar en la taula x com el pH més alt és de 8,24 i el més baix de 7,61. En el cas de la conductivitat el valor mínim és de 32,7 i màxim de 47,4 mS/cm (of Science,O. 2002). El valor mínim de conductivitat obtingut no entra en el rang, pot ser perquè aquesta mesura s'ha pres després de fer els assaigs i el diòxid de carboni de l'aire hagi pogut modificar aquest paràmetre, també pot ser a causa d'un error experimental o del sensor. De totes maneres els resultats obtinguts amb els llixiviats que tenen valors de conductivitat fora del rang no surten de l'esperat, es podria considerar que el rang de conductivitat per sota podria ser menor que 40 mS/cm.

4.2. Resultats *A.fischeri*

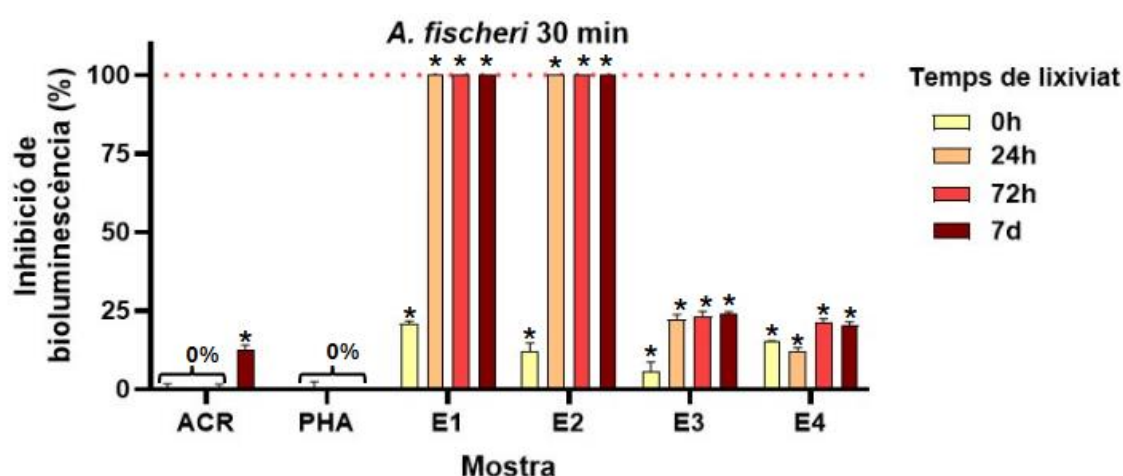


Figura 9: Resultats d'inhibició de bioluminescència en *A. fischeri* a 30 minuts d'exposició. Els valors es representen en forma de percentatge (%) i s'han normalitzat respecte al grup control de llixiviats. Els diferents temps de llixiviació de les mostres s'observen amb diferents colors a les barres com indica la llegenda. La línia discontinua ataronjada indica una inhibició de creixement total (100%). Els asteriscs indiquen els grups significativament diferents del control. També s'indica el 0% inhibició a aquelles condicions on no s'aprecia la barra. Les barres i els bigots de cada condició representen la mitjana i la SEM (Standard Error of the Mean), respectivament.

Començant amb els polímers (ACR i PHA) es pot observar que tots dos tenen una inhibició del 0% (no presenten toxicitat) excepte l'ACR que mostra diferències significatives en el temps de llixiviats a 7 dies (inhibició del 12,43%). Totes les pintures (E1, E2, E3 i E4) mostren diferències respecte al control, inclús als llixiviats de 0 h. S'han obtingut resultats molt semblants per les pintures E1 i E2, amb una inhibició baixa en el llixiviats a 0 h (20,91 i 12,09%, respectivament) i a partir de les 24 h una inhibició del 100%. Continuant amb l'E3 i l'E4, també presenten toxicitat i un comportament bastant semblant entre elles: a 0 h E3 i E4 presenten una inhibició d'un 5,6% i 15,17%, respectivament. Entre 24 h i 7 d E3 presenta una inhibició al voltant del 23%, i E4 d'entre un 12 i 21%.

4.3. Resultats *P. Tricornutum*

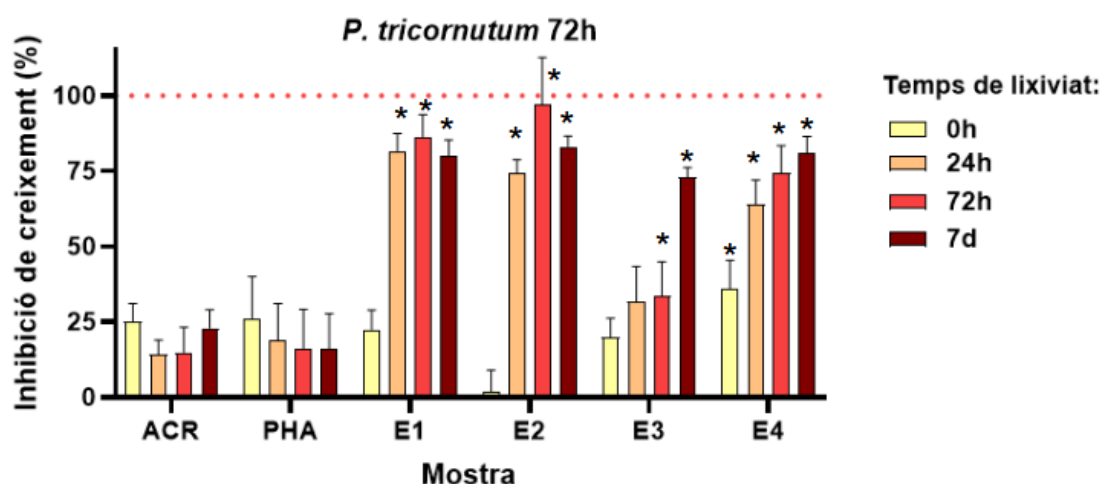


Figura 10: Resultats d'inhibició de creixement en *P. tricornutum* a 72 h d'exposició. Els valors es representen en forma de percentatge (%) i s'han normalitzat respecte al grup control de llixiviament. Els diferents temps de llixiviament de les mostres s'observen amb diferents colors a les barres com indica la llegenda. La línia discontinua ataronjada indica una inhibició de creixement total (100%). Els asteriscs indiquen els grups significativament diferents del control. Les barres i els bigots de cada condició representen la mitjana i la SEM (*Standard Error of the Mean*), respectivament.

En la figura 10 s'observa que els dos polímers (ACR i PHA) mostren inhibicions baixes i, juntament amb les mostres E1, E2 i E3 a temps de llixiviament 0 h, no presenten diferències significatives respecte al control. En el cas d'E1 i E2, a partir d'un llixiviament de 24 h s'observa inhibició propera al 100%. Segons els resultats del Tukey test mostrats en la taula 5 no hi ha diferències significatives entre aquestes dues mostres, indicant que tenen efectes similars. Pel que fa a la mostra E3, els resultats del llixiviament a 24 h tampoc difereixen del control, els llixiviats de 72 h i 7 d sí que presenten diferències significatives, amb aquest últim mostrant una toxicitat que inhibeix aproximadament un 75% del creixement. Finalment, en la mostra E4, tots els llixiviats presenten diferències significatives respecte al control. A la figura es veu que a mesura que augmenta el temps del llixiviament de la mostra augmenta la toxicitat, però, segons l'anàlisi estadística presentat en la taula 5 no hi ha diferències significatives entre els resultats obtinguts en els llixiviats de 24 h, 72 h i 7 d. En l'E4 l'únic que es diferencia significativament del llixiviament a 0 h és el de 7 d.

4.4. Resultats *B.Plicatilis*

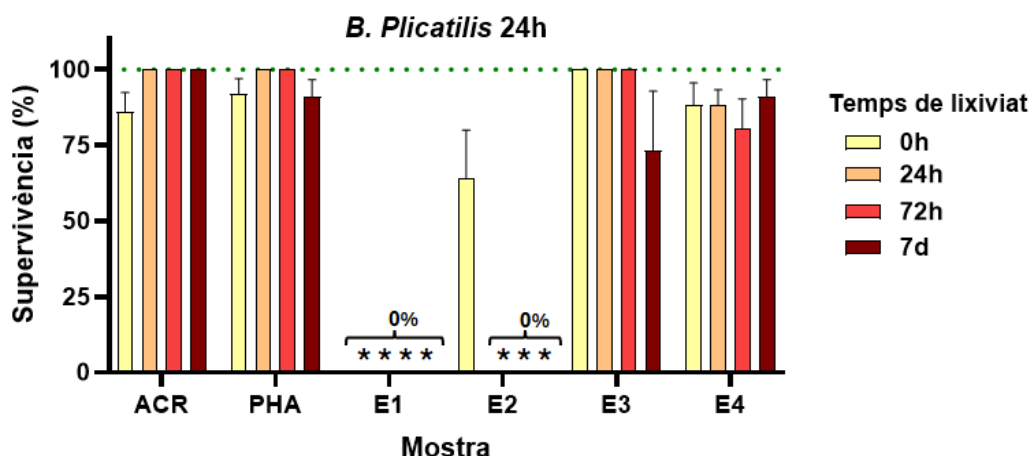


Figura 11: Resultats de supervivència (%) en *B.Plicatilis* a 24 h d'exposició. Els valors es representen en forma de percentatge i s'han normalitzat respecte al grup control del lixiviat (supervivència pròxima al 100%). Els diferents temps de lixiviació de les mostres s'observen amb diferents colors a les barres com indica la llegenda. La línia discontinua verda indica una supervivència total dels individus (100%). Els asteriscs indiquen els grups significativament diferents del control. En la figura també s'ha indicat el 0% de supervivència d'aquelles condicions on no es pot apreciar la seva barra. Les barres i els bigots de cada condició representen la mitjana i la SEM (Standard Error of the Mean), respectivament.

En aquest assaig, les úniques mostres que han donat toxicitat en el rotífer són E1 per tots els temps de lixiviat i E2 per tots excepte a 0 h. En la figura, es pot apreciar com la supervivència dels individus exposats al lixiviat de 0 h d'E2 és més baixa que la resta (64%); tot i això, no presenta diferències significatives, ja que presenta una gran variabilitat. L'estadística de la taula 5 ha confirmat que les dues úniques mostres que presenten diferències significatives són E1 i E2 en els temps indicats en la figura 11.

4.5. Resultats *A.Franciscana*

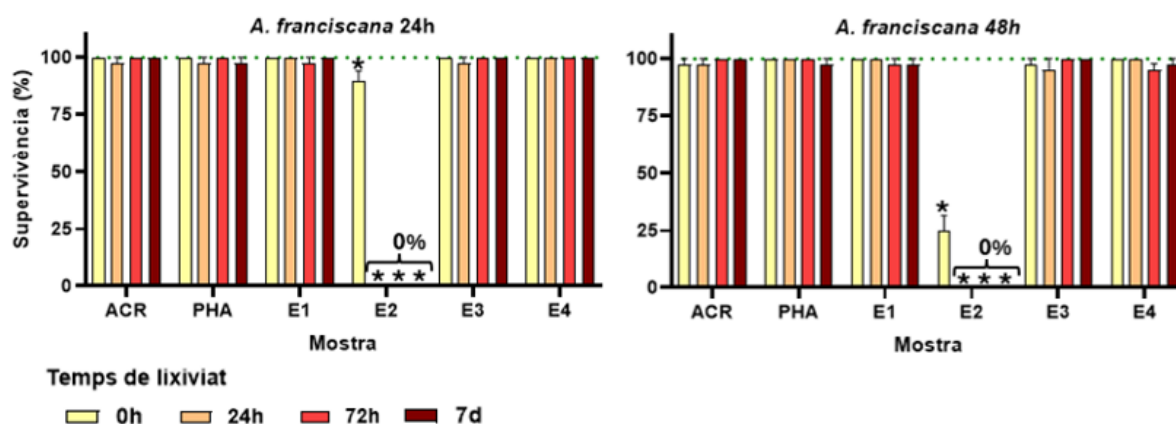


Figura 12: Resultats de supervivència en *A. franciscana* a 24 h i 48 h d'exposició. Els valors es representen en forma de percentatge i s'han normalitzat respecte al grup control, ja que el grup control tenia supervivència del 100%. Els diferents temps de lixiviació de les mostres s'observen amb diferents colors a les barres com indica la llegenda. La línia discontinua indica una supervivència total dels

individus (100%). Els asteriscs indiquen els grups significativament diferents del control. En la figura també s'ha indicat el 0% de supervivència. Les barres i els bigots de cada condició representen la mitjana i la SEM (*Standard Error of the Mean*), respectivament.

En aquesta figura es pot observar que l'única mostra que presenta toxicitat és l'E2 tant a 24 com a 48 hores d'exposició. Aquesta mostra al lixiviat de temps 0 h presenta menys toxicitat, tot i que 48 hores després d'exposició es mostra una baixada de la supervivència respecte a l'exposició de 24 hores, com era esperable. Els lixiviats d'E2 a 24 h, 72 h i 7 d indiquen un 0% de supervivència als dos temps d'exposició. En veure que a partir del lixiviat d'E2 a 24 h ja hi ha una mortalitat del 100% s'ha volgut determinar a quina concentració relativa de lixiviat s'obindrà la EC_{50} , que indica a quina concentració relativa de lixiviat E2 24 h provoca un 50% de supervivència. S'ha fet exposant l'organisme al 100, 75, 50, 25 i 0% de la mostra durant 24 i 48 hores.

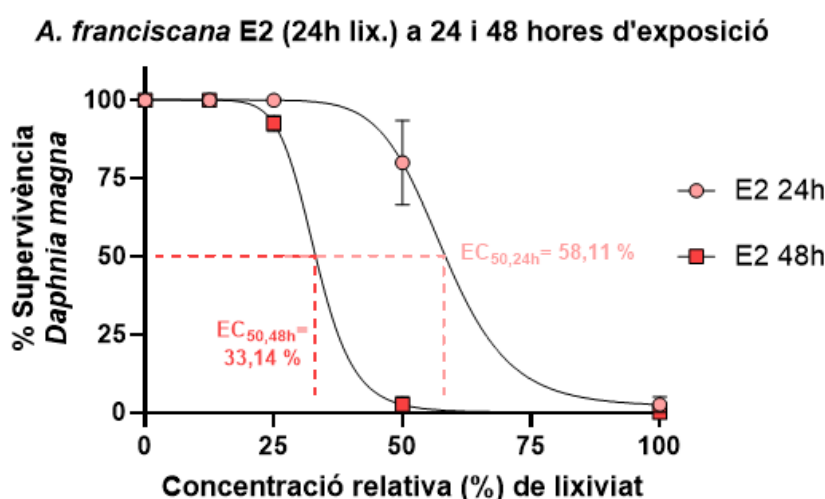


Figura 13: Resultats de supervivència en *A. franciscana* a 24 h i 48 h d'exposició. Els resultats estan expressats mitjançant una corba dosis-resposta (model d'equació de Hill) per a cada temps d'exposició, on a l'eix y s'indica la supervivència de l'*Artèmia franciscana* i a l'eix x la concentració relativa del lixiviat d'E2 a 24 h. En la llegenda està indicat quins punts representen cada corba d'exposició. La figura també mostra el valor d' EC_{50} de cada corba. Els punts i bigots indiquen la mitjana i la SEM, respectivament, a cada condició.

En la figura 13, s'observa com, per l'exposició al lixiviat d'E2 (24 h de lixiviat) s'obté una $EC_{50,24h} = 58,11\%$ (24 h d'exposició) i per l'exposició de 48 hores l' $EC_{50,48h} = 33,14\%$ (48 h d'exposició), considerant el 100% com la mostra de lixiviat original d'E2 després de 24 h de lixiviat.

4.6. Resultats diferències significatives ANOVA

	<i>A. fischeri</i>					<i>P. tricornutum</i>					<i>B. plicatilis</i>					<i>A. franciscana</i>				
	Ctl	0h	24h	72h	7d	Ctl	0h	24h	72h	7d	Ctl	0h	24h	72h	7d	Ctl	0h	24h	72h	7d
ACR	A	BA	A	BA	DC	A	AB	AB	AB	AB	AB	AB	A	A	A	A	A	A	A	A
PHA	A	A	BA	A	A	A	AB	AB	AB	AB	AB	AB	A	A	AB	A	A	A	A	A
E1	A	FE	G	G	G	A	AB	E	E	E	A	C	C	C	C	A	A	A	A	A
E2	A	DC	G	G	G	A	AB	E	E	E	AB	B	C	C	C	A	B	C	C	C
E3	A	CB	FE	FE	F	A	AB	AC	BC	DE	AB	A	A	A	AB	A	A	A	A	A
E4	A	ED	DC	FE	FE	A	BCD	CE	DE	E	AB	AB	AB	AB	AB	A	A	A	A	A

Taula 5: Diferències significatives de les condicions en cada organisme. A la part esquerra de la taula hi ha les mostres, mentre que en la part superior s'hi troben els organismes i sota d'aquests els temps de lixiviat, cal remarcar que en aquest cas el grup control (Ctl) és realment el control de lixiviat. Cada lletra representa un conjunt de grups que no tenen diferències significatives en les seves mitjanes. Si dos grups comparteixen almenys una lletra no es poden considerar significativament diferents.

En els resultats d'ANOVA d'*A. fischeri* es mostra en la taula 5, com ACR només mostra toxicitat en el temps de lixiviat a 7 d. En canvi, el polímer PHA no mostra cap diferència significativa respecte al control. E1, E2, E3 i E4 presenten toxicitat en tots els lixiviats, inclòs a t=0 h de lixiviat. Concretament, E1 i E2 són els que més toxicitat s'observa en els lixiviats de 24 h, 72 h i 7 d. Entre E3 i E4, E3 és més tòxic a temps de lixiviat=24 h, i E4 a temps de lixiviat=0 h, cosa que també es veu representat en la figura 9. Tant a 72 h com a 7 d són igual de tòxics. En l'E3 el lixiviat de 0 h ha donat una inhibició inferior i diferent significativament a la resta de temps de la mostra. Els resultats de l'E4 indiquen que el temps 0 h i 24 h no tenen diferències significatives entre ells, però, 24 h sí que en presenta amb els seus lixiviats de 72 h i 7 d.

El següent organisme de la taula x és l'alga *P. tricornutum*. En aquest cas, els lixiviats d'ACR i PHA no presenten cap diferència significativa amb el control. L'únic lixiviat de 0 h significativament diferent al control és el d'E4. Els lixiviats de 24 h, 72 h i 7 d de les mostres E1 i E2 són iguals i presenten més toxicitat que tota la resta, juntament amb el d'E4 a 7 d. En el cas dels lixiviats de 24 h, el d'E3 no difereixen respecte al control, mentre que el d'E4 per aquest mateix temps sí que ho fa. A 72 h, els resultats d'E3 i E4 difereixen entre ells i respecte al control. Finalment, a 7d E3 i E4 no difereixen entre ells, però el d'E4 mostra una diferència més gran respecte al control.

Continuant amb els resultats de *B. plicatilis* en la taula 5, s'ha obtingut toxicitat en les pintures E1 i E2. En el cas de l'E1 els resultats dels lixiviats no presenten diferències significatives entre els diferents temps, però sí respecte al control. Pel que fa a l'E2, el lixiviat de 0 h no difereix del control, mentre que els de 24 h, 72 h i 7 d sí. Els lixiviats d'E1 i E2 que produeixen toxicitat són estadísticament iguals, ja que la mortalitat exercida va ser total (0% de supervivència, veure la figura 10).

En els resultats de *A. franciscana* en la taula, l'única mostra que presenta toxicitat és la pintura E2. En aquesta la toxicitat del lixiviat de 0 h és inferior als de 24 h, 72 h i 7 d.

4.7. Anàlisi integrat

El PCA (anàlisi de components principals) és una tècnica d'anàlisi estadística utilitzada per reduir les dimensions d'un conjunt de dades, mantenint gran part de la variabilitat de les dades originals (Bro & Smilde, 2014). S'ha utilitzat per tal de poder identificar patrons de toxicitat, concretament la similitud dels resultats de les mostres entre elles (Figura 14 A) i com varia la toxicitat depenent del temps de lixiviat (Figura 14 B). Gràcies a la reducció de les dimensions de la PCA s'ha pogut identificar els grups que tenen respostes similars, donant una visió global de la toxicitat.

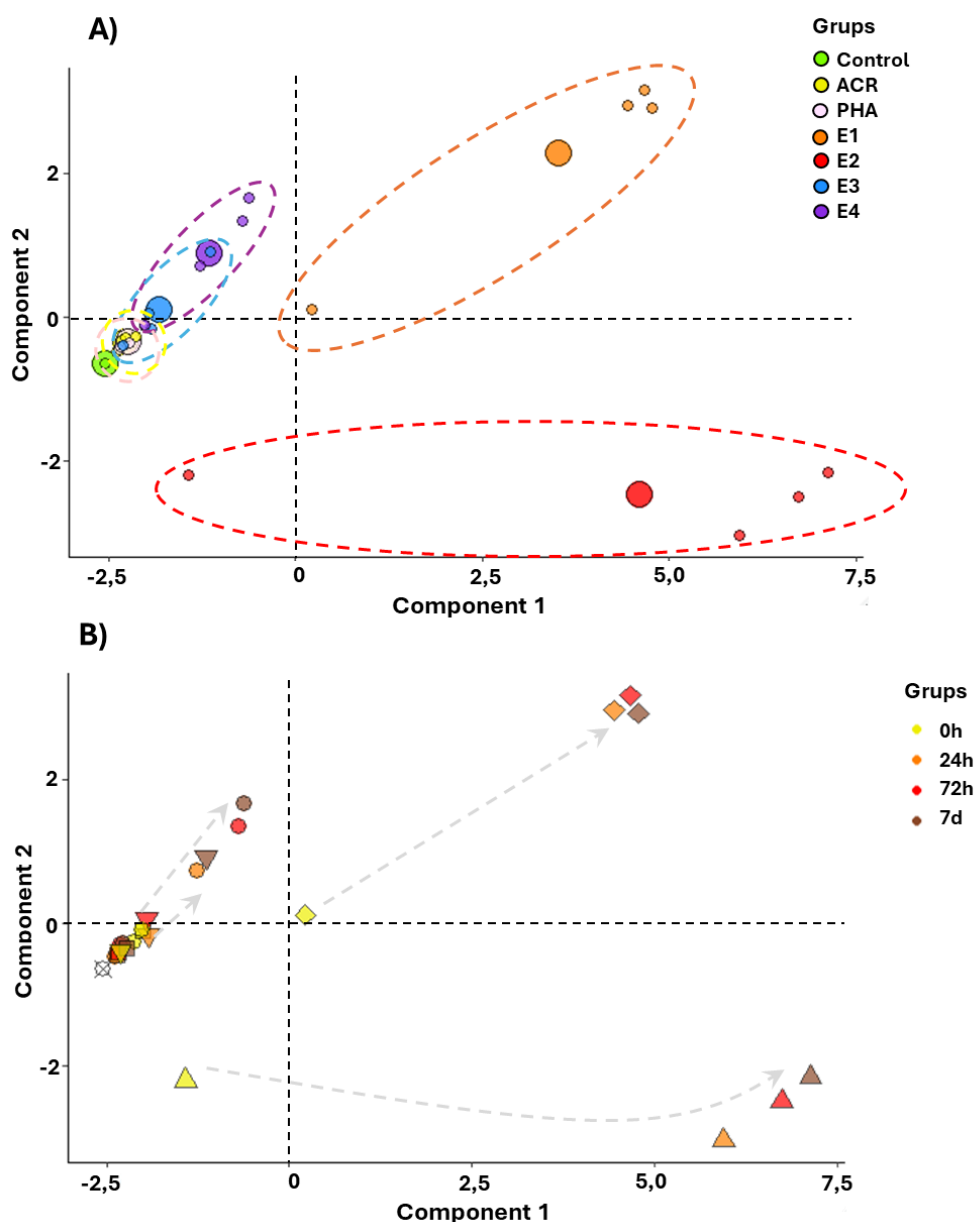


Figura 14: Representació de dues PCA's. A) està feta indicant la variabilitat de les mostres, indicant amb el·lipsis els punts que formen part del mateix grup. El punt més gran indica la posició mitjana. En la llegenda s'indica quin color representa cada mostra. B) indica la variància de les dades respecte al temps de lixiviat (de groc a marró, segons s'incrementa el temps de lixiviat). També es veuen representades fletxes que indiquen la tendència dels temps dels lixiviat. En la llegenda s'indica quin color representa cada temps de lixiviat. El control s'ha indicat amb una creu encercolada, ACR i PHA amb quadrats, E1 amb rombes, E2 amb triangles, E3 amb triangles invertits, i E4 amb cercles.

Com es pot observar en la figura 14, la PCA de dalt (A) presenta com el comportament de la E1 i E2 és totalment diferent de la resta (i entre ells). Això és degut al fet que aquestes són les que mostren més toxicitat comparat amb la resta (observar figures 9, 10, 11 i 12). També es pot observar que l'E4 té un comportament lleugerament més diferenciat del control (a causa de la seva toxicitat en la *Phaeodactylum tricornutum*, figura 10). Per altra banda, l'E3, ACR i PHA s'agrupen de forma molt propera al control.

En la figura 14, a la PCA de baix (B) es veu que com més temps de lixiviat presenta una mostra amb més toxicitat, ja que s'allunyen més en el gràfic respecte al control. Aquesta tendència està més marcada, sobretot, en la part inferior corresponent als punts de la mostra E2.

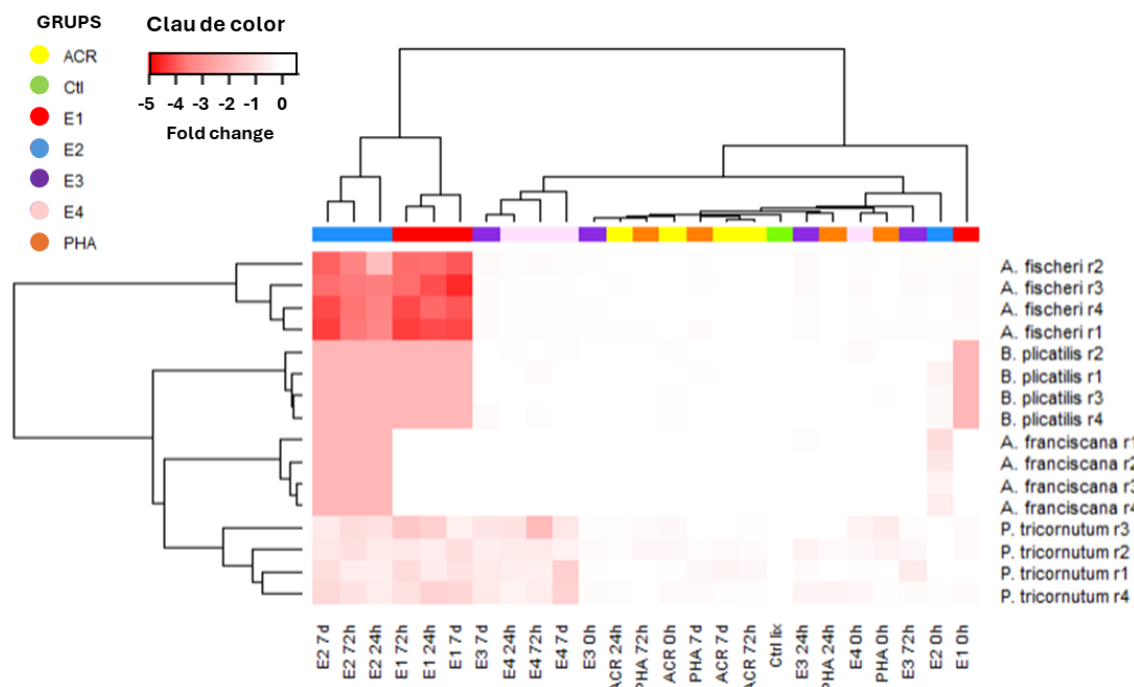


Figura 15: Heatmap de la toxicitat de les mostres a diferent temps de lixiviat i dels replicats de cada espècie. A la part superior s'observa claus que relacionen els lixiviats de mostres que actuen similarment (hierarchical clustering). A l'esquerra de la figura es presenta el hierarchical clustering dels replicats de les espècies. A la llegenda s'indica el color de cada mostra i la clau de color (més vermell com més toxicitat).

A la dreta de la figura 15 es pot observar com tots els replicats s'agrupen entre ells per espècie, això vol dir que dins de cada espècie hi ha poca variabilitat en els resultats, el qual és símptoma que s'ha fet bé l'experimental. Observant els organismes, a la clau de l'esquerra es pot veure com l'*Aliivibrio fischeri* difereix de la resta d'organismes, això és perquè aquest es veu més afectat per la toxicitat dels lixiviats d'E1 i E2. Els organismes amb més similituds són l'*Artèmia franciscana* i la *Phaeodactylum tricornutum*, pel que fa al *Brachionus plicatilis* difereix d'aquests dos, si s'observa el color del heatmap és més semblant a l'*Aliivibrio fischeri*.

En la figura 15 la clau en la part superior del gràfic presenta com la majoria de mostres s'agrupen al voltant del control, els lixiviats d'E3 7 d i E4 24 h, 72 h i 7 d es diferencien lleugerament d'aquesta agrupació, també es pot veure per E1 0 h. Finalment, les mostres que difereixen més d'aquesta agrupació al voltant del grup control són E1 i E2 a 24 h, 72 h i 7 d, que són les que presenten més toxicitat.

5. DISCUSIÓ:

5.1. Polímers

Partint dels resultats d'aquest estudi, generalment s'ha observat que, de totes les mostres, les menys tòxiques són els polímers, tant el convencional (ACR, poliacrilat) com el nou biopolímer (PHA, polihidroxialcanoat). En concret, l'ACR és una substància que pràcticament no presenta toxicitat a curt termini, ja que és un material que té una estructura química estable, és inert i que a causa de la seva difícil degradació pràcticament no allibera substàncies tòxiques (Ahlers et al., 2006). Malauradament, presenta una lleugera toxicitat en bacteris amb el pas del temps (*A. Fischeri* a 7 d de lixiviació) probablement per alliberació d'alguns monòmers i oligòmers. El PHA, en canvi, és un material biodegradable produït a través de processos microbians de fermentació i que no presenta toxicitat residual en degradar-se, per tant, és normal que hagi sortit el material menys tòxic d'entre totes les mostres (no presenta cap classe de toxicitat en cap organisme; ni tan sols després de 7 dies de lixiviació) (Tanadchangsang & Pattanasupong, 2022; G. X. Wang et al., 2021).

La substitució d'un polímer fòssil per un de biobasat i biodegradable pot tenir diversos avantatges, la primera és que mentre el primer s'acumula i persisteix en l'ambient provocant efectes a llarg termini, el segon és biodegradat de forma que de forma que acaba essent menys tòxic.

5.2. Pintures

Per la banda de les pintures (E1, E2, E3 i E4), els resultats mostren com la toxicitat més alta ha estat produïda per les pintures E1 i E2, tal com estava previst al ser aquestes les úniques que contenen biocides (compostos utilitzats a tal efecte). Com es pot veure a la taula 2, la pintura E1 conté Cu, Cu₂O i piritiona de coure, alliberant al medi Cu²⁺ que a l'entrar a les cèl·lules es redueix en forma de Cu⁺. El Cu⁺ té afinitat per unir-se als grups -SH de les ATPases provocant canvis estructurals que perjudiquen el transport de ions, provocant la mort dels organismes (Katrantsas et al., 2003). L'E1 també conté Zn, que en l'aigua s'acostuma a trobar en forma de Zn²⁺, i que en concentracions tòxiques pot provocar inhibició de la divisió cel·lular i del creixement, ja que pot travessar membranes de cèl·lules. El Fe es troba en forma de Fe²⁺ i Fe³⁺, aquest és un nutrient necessari per a molts processos biològics tot i que en altes concentracions pot esdevenir tòxic provocant estrès oxidatiu, danys cel·lulars, enzimàtics entre d'altres (Hou et al., 2018). La colofònia de la pintura és un producte natural, no tòxic, que s'utilitza per posar en contacte els tòxics de la pintura i l'aigua de mar, és soluble i permet alliberar el tòxic més lentament (Phillip, 1973).

L'altra pintura amb alta toxicitat en els resultats és la E2. Aquesta presenta toxicitat perquè igual que la E1, conté un biocida (en aquest cas, el DCOIT). El DCOIT és una isotiazolinona utilitzada en pintures antiincrustants, la qual té la capacitat de travessar membranes cel·lulars fàcilment, provocant estrès oxidatiu i necrosis. L'estrès oxidatiu és provocat perquè el DCOIT s'uneix al centre actiu de l'enzim glutatió reductasa inhibint-lo, aquest enzim té un paper clau en mantenir l'entorn reductor en les cèl·lules (Wendt et al., 2016). A més, la pintura conté Fe com la E1 i podria provocar toxicitat si la seva concentració al medi fossi massa alta. Com a altres elements, conté PDMS/PEG les quals són matrius no tòxiques, el seu paper en la

pintura és evitar que els organismes s'hi adhereixin a través de les seves propietats físiques (Lejars et al., 2012). Aquesta també conté dibenzoat de dipropilenglicol el qual és un plastificant que presenta toxicitat baixa en alguns microorganismes i també podria participar en la toxicitat global de l'E2. Cal remarcar que E2 és l'única mostra que presenta toxicitat en totes les espècies (Butz et al., 1982).

Finalment, les pintures E3 i E4 presenten toxicitat menor a l'E1 i E2. Aquestes no contenen biocides i es diferencien perquè una té el polímer tradicional ACR (E3) i l'altre el nou biopolímer PHA (E4). La toxicitat en aquestes mostres podria estar produïda pel Fe, pel copolímer PDMS/PEG i/o pel dibenzoat de dipropilenglicol. Es pot observar en la figura 14, el PCA referent a les mostres, com l'E4 es diferencia lleugerament més, indicant lleugerament més toxicitat (arrossegat principalment per la seva lleugera major toxicitat en la diatomea). Això pot esdevenir perquè al biodegradar-se el polímer PHA, alliberi més fàcilment el contingut de la pintura com pot ser el Fe, el copolímer PDMS/PEG i el dibenzoat de dipropilenglicol. A més, en algunes ocasions, les propietats mecàniques dels polímers biobasats no són tan bones com les dels polímers fòssils i la quantitat d'additius afegits ha de ser major per compensar aquesta pèrdua de propietats (provocant així una concentració més alta al medi a mesura que es van alliberant). La composició exacta (%) de cada component no s'ha pogut proporcionar per temes de confidencialitat i faria falta un estudi més complet de totes les mostres per poder confirmar-ho.

5.3. Filotoxicitat

També en avaluar l'ecotoxicitat cal tenir en compte la diferent sensibilitat de les espècies a cada substància (filotoxicitat). Per començar, l'*Aliivibrio fischeri* (bacteri) presenta una alta sensibilitat a diferents metalls, entre ells el Zn, Cu i Fe, per tant, és lògic que en els resultats mostri toxicitat per totes les mostres excepte els polímers (Abbas et al., 2018). En el cas d'ACR 7 d la toxicitat pot ser deguda a l'alliberació gradual d'alguns monòmers i oligòmers (la concentració dels quals no fos pro alta a temps menors per a presentar toxicitat). Per la *Phaeodactylum tricornutum* (diatomea) és una alga amb alta sensibilitat a tòxics, i per això en els resultats de totes les mostres presenten toxicitat en menor o major mesura. Sobretot és sensible per metalls pesants, com pot ser els que presenten les pintures, i justifica que E3 i E4 també presentin toxicitat encara de no tenir biocides (però sí Fe) (W.-X. Wang & Dei, n.d.). En el *Brachionus plicatilis* (rotífer) sobretot s'ha observat sensibilitat en les mostres E1 i E2 (més en E1 ja que aquest és molt sensible al Cu) (W.-X. Wang & Dei, n.d.). Per acabar, l'*Artèmia franciscana* només ha mostrat sensibilitat amb la pintura E2, la qual és l'única que conté biocida DCOIT (taula 2). Això suposa un indicatiu que aquest component ha estat tòxic per l'artròpode.

Respecte les espècies treballades es podria dir que la més sensible és la *Phaeodactylum tricornutum*, perquè com es pot observar a la figura 10, és l'única espècie que presenta toxicitat per totes les mostres incloent els polímers.

5.4. Temps de lixiviació

Pel que fa als temps de lixiviat (com es pot observar a la figura 14 B) s'ha obtingut que com més temps de contacte del polímer/pintura amb el medi implica més toxicitat. També en la taula 5, per cada organisme, si s'observa com es diferencien els resultats que presenten toxicitat, generalment es veu com a mesura que el temps de lixiviat augmenta el lixiviat difereix més del control. Tot i que l'alliberament dels tòxics en les pintures varia segons la composició d'aquestes, en general la seva alliberació és proporcional al temps, indicant que a 7 dies encara s'alliberen substàncies tòxiques i que no hem arribat a la fase d'equilibri. La quantitat de substàncies lixivades en el medi depèn del tipus de polímer, la mida de les partícules, la quantitat de mostra/medi i l'afinitat entre polímers i additius (Almeda et al., 2023b).

Se sap que el polímer ACR s'hidrolitza fàcilment alliberant-se al medi, però que per ell mateix no és tòxic. Malgrat això, en pintures com l'E1, E2 i E3 aquest es troba unit als metalls per grups èster (els quals també són fàcilment hidrolitzables), alliberant el metall al medi i intercanviant-lo per algú catió alcalí o alcalinoterri (Omae, 2003). El PHA de la pintura E4 tampoc és tòxic, però actua de forma diferent, podent degradar-se en metà i diòxid de carboni sota condicions anaeròbiques. A més, el PHA s'allibera en el medi més ràpidament en el medi, i per aquest motiu les pintures que utilitzin aquest polímer poden mostrar més toxicitat aguda (a curt termini) (Almeida et al., 2007).

Per tots els motius anteriorment indicats i observant les diferents gràfiques generades durant el treball, podem arribar a la següent classificació relativa de toxicitat de les mostres analitzades, de més tòxica a menys: **E2 > E1 > E4 > E3 > ACR > PHA**.

5.5. Rellevància

Cal donar importància a l'objectiu de les pintures, que és evitar la incrustació dels microorganismes en el casc de les embarcacions. Per tant, aquestes han de ser tòxiques, però la toxicitat no pot afectar de forma indiscriminada a tots els organismes. Així doncs, cal buscar un equilibri, aquest es troba en l'optimització d'una alliberació controlada dels biocides. Això es pot aconseguir mitjançant la selecció de substàncies químicament actives que no siguin tòxiques per a tots els organismes, i que els seus efectes siguin per a grups d'organismes concrets (Yebra et al., 2004).

5.6. Passes futures

En un futur, dins del projecte Nautilus, es farà una anàlisi dels lixiviats per tal de veure les substàncies alliberades en aquests, mitjançant ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrofotometry*) per determinar els metalls alliberats i HPLC-MS (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) per determinar les substàncies orgàniques. El primer és una anàlisi que se sol utilitzar per determinar metalls, ja que permet identificar aproximadament 80 elements de la taula periòdica i quantificar la seva concentració. El segon és una tècnica que permet la separació (per afinitat amb la columna cromatogràfica utilitzada), identificació (per relació mida-càrrega) i quantificació de components químics en la mostra i normalment s'emptra per determinar compostos amb un esquelet de carbonis (Hübschmann, 2015). Tot i que aquests dos procediments poden veure dificultats (tècniques) per la gran quantitat de sal que hi ha en l'ASW, s'espera poder extreure uns resultats prou precisos per

ajudar en l'explicació de la toxicitat de les mostres, podent correlacionar aquesta última amb la concentració de metalls i compostos orgànics (potencialment tòxics) en cada mostra.

6.CONCLUSIONS:

In this ecotoxicological study, the toxicity of marine ship polymers and antifouling paints (ACR, PHA, E1, E2, E3, and E4) on *Aliivibrio fischeri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Brachionus plicatilis*, and *Artemia franciscana* was studied. The results revealed that the samples containing heavy metals, biocides, and acrylic polymer are the most toxic (E1 and E2), followed by those without biocides but with metals (E3 and E4). It was also concluded that the polymers (PHA and ACR) are not toxic, except in the case of ACR, which can cause minor toxicity in bacteria due to bioaccumulation since it is not as biodegradable as PHA. The paint with the biopolymer and without biocides (E4) turned out to be more toxic than the one containing the acrylic polymer and no biocides (E3), because the biopolymer (PHA) degrades faster, exposing the toxins compared to the acrylic polymer (ACR).

The obtained results not only provide information on the direct impact of the samples on the organisms but also show how these substances can have larger-scale implications, such as on the health of marine ecosystems. Many of the toxic substances released from the paints accumulate in microorganisms, and these are eventually transferred to other trophic levels, generating a significant environmental impact. All of this can also end up harming humans, as the loss of biodiversity can endanger the sustainability of food sources creating conflict in society, since marine fauna constitutes a large proportion of the global protein consumed, it is estimated that 40 times more animal biomass is harvested from the sea than from land. For these reasons of environmental and human impact, society must put effort into regulating the substances released into the marine environment. One way to do this is by improving the efficiency of technologies that interact with the marine environment (McCauley et al., 2015).

In 2015, the UN approved the 2030 Agenda for Sustainable Development to guide countries and societies towards improving people's lives. This project includes 17 goals, with number 14 focusing on marine life and how oceans eutrophication, acidification, global warming, and plastic pollution are deteriorating its health. It argues that to counteract these effects, swift and coordinated global action is needed (ODS, n.d.).

Through the Nautilus project, efforts are being made to advance with antifouling paints design towards a sustainable future while effectively preventing fouling on ship hulls. New technologies in antifouling paints are progressing along different lines of research, such as non-stick paints. These have extremely smooth surfaces with minimal friction, thereby greatly impeding organism fouling and preventing mortality and contamination of microorganisms. In a near future, the goal is for these paints to degrade much more rapidly in the environment, accumulate fewer in the environment and biota and employ controlled release mechanisms for biocides that are chemically active, biodegradable and as non-toxic as possible (Yebra et al., 2004).

In conclusion, this study emphasizes the urgent need for improved management of marine ecosystem pollution, as oceans and seas are essential reservoirs of resources for humanity and for the planet. It is crucial to implement effective and sustainable policies that promote the

conservation of marine ecosystems, reducing the negative effects of both physical and chemical pollution. Furthermore, promoting research and innovation in clean technologies and management practices is necessary to preserve ocean health for future generations.

7.BIBLIOGRAFIA:

- Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G. A., Asif Tahir, M., & Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment*, 626, 1295–1309. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.01.066>
- Ahlers, J., Riedhammer, C., Vogliano, M., Ebert, R.-U., Ku'hne, R., Ku'hne, K., & Schu", G. S. (2006). ACUTE TO CHRONIC RATIOS IN AQUATIC TOXICITY-VARIATION ACROSS TROPHIC LEVELS AND RELATIONSHIP WITH CHEMICAL STRUCTURE. In *Environmental Toxicology and Chemistry* (Vol. 25, Issue 11). <http://etc.allenpress.com>
- Almeda, R., Gunaalan, K., Alonso-López, O., Vilas, A., Clérandeau, C., Loisel, T., Nielsen, T. G., Cachot, J., & Beiras, R. (2023a). A protocol for lixiviation of micronized plastics for aquatic toxicity testing. *Chemosphere*, 333, 138894. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138894>
- Almeda, R., Gunaalan, K., Alonso-López, O., Vilas, A., Clérandeau, C., Loisel, T., Nielsen, T. G., Cachot, J., & Beiras, R. (2023b). A protocol for lixiviation of micronized plastics for aquatic toxicity testing. *Chemosphere*, 333. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138894>
- Almeida, E., Diamantino, T. C., & de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59(1), 2–20. <https://doi.org/10.1016/J.PORGOAT.2007.01.017>
- Annual global plastic waste generation by industrial sector, 2019*. (n.d.). Retrieved July 1, 2024, from <https://ourworldindata.org/grapher/plastic-waste-by-sector>
- Artemia Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Waters STANDARD OPERATING PROCEDURE*. (n.d.).
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812–2831. <https://doi.org/10.1039/C3AY41907J>
- Butz, R. G., Atallah, Y. H., Yu, C. C., & Calo, C. J. (1982). ENVIRONMENTAL SAFETY ASSESSMENT OF DIPROPYLENE GLYCOL DIBENZOATE. In *Environmental Toxicology and Chemistry: Vol. I*.
- EUR-Lex - 02010L0063-20190626 - EN - EUR-Lex. (2010). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02010L0063-20190626>
- Hou, J., Wu, Y., Li, X., Wei, B., Li, S., & Wang, X. (2018). Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. In *Chemosphere* (Vol. 193, pp. 852–860). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.077>
- Hübschmann, H.-J. (2015). *Handbook of GC-MS. Analytical Separation Science*. https://books.google.com/books/about/Analytical_Separation_Science_5_Volume_S.html?hl=es&id=Sm4BCgAAQBAJ
- Karlsson, J., Ytreberg, E., & Eklund, B. (2010). Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 158(3), 681–687. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2009.10.024>

- Katranitsas, A., Castritsi-Catharios, J., & Persoone, G. (2003). The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a non-target marine organism. *Marine Pollution Bulletin*, 46(11), 1491–1494. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00253-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00253-4)
- La falta de igualdad de género en la ciencia nos afecta a todos | Naciones Unidas*. (n.d.). Retrieved July 1, 2024, from <https://www.un.org/es/cr%C3%B3nica-onu/la-falta-de-igualdad-de-g%C3%A9nero-en-la-ciencia-nos-afecta-todos>
- Lejars, M., Margailan, A., & Bressy, C. (2012). Fouling release coatings: A nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. In *Chemical Reviews* (Vol. 112, Issue 8, pp. 4347–4390). <https://doi.org/10.1021/cr200350v>
- Liu, X., Lei, T., Boré, A., Lou, Z., Abdouraman, B., & Ma, W. (2022). Evolution of global plastic waste trade flows from 2000 to 2020 and its predicted trade sinks in 2030. *Journal of Cleaner Production*, 376, 134373. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.134373>
- Los microplásticos en el pescado y los mariscos, ¿deberíamos preocuparnos? | Noticias ONU*. (n.d.). Retrieved June 27, 2024, from <https://news.un.org/es/story/2019/07/1460041>
- Marine Toxicity Test with Microalgae STANDARD OPERATING PROCEDURE*. (n.d.).
- Martino, A. De, Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions1. *Journal of Phycology*, 43(5), 992–1009. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2007.00384.X>
- McCauley, D. J., Pinsky, M. L., Palumbi, S. R., Estes, J. A., Joyce, F. H., & Warner, R. R. (2015). Marine defaunation: Animal loss in the global ocean. *Science*, 347(6219). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1255641>
- ODS. (n.d.).
- of Science, O. (2002). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition*.
- Omae, I. (2003). General aspects of tin-free antifouling paints. *Chemical Reviews*, 103(9), 3431–3448. <https://doi.org/10.1021/cr030669z>
- Our “Love Letter to Phaeodactylum tricornutum” - Aquaholic Aquaculture*. (n.d.). Retrieved July 4, 2024, from <https://www.aquaholicaquaculture.com/blog-all-posts/our-love-letter-to-phaeodactylum>
- Phillip, A. T. (1973). @ Elsevier Sequoia !%A., Lausanne-Prmtd m Belgrum 159 MODERN TRENDS IN MARINE ANTIFOULING PAINTS RESEARCH. In *Progress in Organic Coalings* (Vol. 2).
- Riestra, V. (n.d.). *Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino Artemia franciscana (Crustacea: Artemiidae)*.
- Rotifer Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine waters STANDARD OPERATING PROCEDURE*. (n.d.).
- Shin, J. S., Kim, J. M., Kim, J. S., Min, B. H., Kim, Y. H., Kim, H. J., Jang, J. Y., Yoon, I. H., Kang, H. J., Kim, J., Hwang, E. S., Lim, D. G., Lee, W. W., Ha, J., Jung, K. C., Park, S. H., Kim, S. J., & Park, C. G. (2015). Long-term control of diabetes in immunosuppressed nonhuman primates (NHP) by the transplantation of adult porcine islets. *American Journal of Transplantation*, 15(11), 2837–2850. <https://doi.org/10.1111/ajt.13345>

SOURCES, FATE AND EFFECTS OF MICROPLASTICS IN THE MARINE

- ENVIRONMENT: PART 2 OF A GLOBAL ASSESSMENT Science for Sustainable Oceans*. (n.d.). www.imo.org
- Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T., & Caccone, A. (2006). An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer—*Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(1), 86–98. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2006.04.025>
- Tanadchangsang, N., & Pattanasupong, A. (2022). Evaluation of Biodegradabilities of Biosynthetic Polyhydroxyalkanoates in Thailand Seawater and Toxicity Assessment of Environmental Safety Levels. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 428, 14(3), 428. <https://doi.org/10.3390/POLYM14030428>
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., & Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2823–2829. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.65081-0/CITE/REFWORKS>
- Vibrio fischeri* Bacterium by trilobiteglassworks on DeviantArt. (n.d.). Retrieved July 3, 2024, from <https://www.deviantart.com/trilobiteglassworks/art/Vibrio-fischeri-Bacterium-370828464>
- Wang, G. X., Huang, D., Ji, J. H., Völker, C., & Wurm, F. R. (2021). Seawater-Degradable Polymers—Fighting the Marine Plastic Pollution. In *Advanced Science* (Vol. 8, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/advs.202001121>
- Wang, W.-X., & Dei, R. C. H. (n.d.). *Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton*. www.elsevier.com/locate/envpol
- WATERTOX-STD | Ecotest. (n.d.). Retrieved June 27, 2024, from <https://ecotestsl.com/producto/watertox-std/>
- Wendt, I., Backhaus, T., Blanck, H., & Arrhenius, Å. (2016). The toxicity of the three antifouling biocides DCOIT, TPBP and medetomidine to the marine pelagic copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 25(5), 871–879. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1644-8>
- Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178, 483–492. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2013.02.031>
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2), 75–104. <https://doi.org/10.1016/J.PORGCAT.2003.06.001>