



Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería en Medioambiente  
Ingeniería Ambiental

**Evaluación del estrés oxidativo en el poliqueto *Perinereis gualpensis*  
(Jeldes, 1963) en sedimentos estuarinos intermareales de la zona central de  
Chile.**

**Trabajo de titulación para optar al título de:  
Ingeniero Ambiental**

**AUTOR: Manuel Alvarez González  
PROFESOR GUÍA: Dr. Hernán Gaete Olivares**

**VALPARAÍSO, CHILE**

**2016**



# Agradecimientos

En primer lugar a mis padres que estuvieron presentes en todo momento, apoyándome en forma incondicional en todos los aspectos relacionados con mi carrera universitaria.

También agradezco a mis hermanas y familia que me apoyan en todos los aspectos de mi desarrollo personal. A los amigos que estuvieron durante mi estadía en Valparaíso.

A mi profesor guía y demás profesores que trabajaron apoyándome en la realización de este trabajo, a los encargados de los laboratorios en los que estuve realizando mediciones y a todos los compañeros de universidad que contribuyeron de alguna forma al cumplimiento de los objetivos de esta tesis.

## Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el estrés oxidativo en el poliqueto *Perinereis gualpensis* presente en sedimentos estuarinos intermareales de la zona central de Chile. Para ello, en los organismos colectados se determinó su actividad antioxidante (Catalasa) y daño oxidativo (TBARS), además se determinaron las concentraciones de metales pesados (Cd, Cu, Pb, Zn, Fe) en tejidos y sedimentos. Los resultados muestran que las concentraciones de metales en sedimentos fueron más altas en el estuario del río Aconcagua con concentraciones de  $48 \pm 2$   $\mu\text{g/g}$  de cobre,  $153.970 \pm 19.267$   $\mu\text{g/g}$  de fierro,  $20 \pm 3$   $\mu\text{g/g}$ , para el plomo y  $143 \pm 20$   $\mu\text{g/g}$  de zinc. En los tejidos no se siguió la misma tendencia ya que el plomo y el fierro tuvieron mayor concentración en el estuario del río Maipo y se encontró cadmio solo en el estuario Laguna de Zapallar. La actividad antioxidante fue más alta en el estuario del Aconcagua y el daño oxidativo en el estuario Laguna de Zapallar relacionándose con las concentraciones de metales en tejido significativamente. En conclusión los metales están biodisponibles provocando estrés oxidativo en *P. gualpensis*.

# Abstract

The objective of this study was to evaluate oxidative stress in the polychaete *Perinereis gualpensis* present in intertidal estuarine sediments of central Chile. To this end, in the organisms collected was detected the antioxidant activity (catalase) and oxidative damage (TBARS), there also was concentrations heavy metals (Cd, Cu, Pb, Zn, Fe) found in tissues and sediments. The results show that the concentrations of metals in sediments were higher in the estuary of the Aconcagua river with concentrations of  $48 \pm 2$   $\mu\text{g/g}$  of copper,  $153.970 \pm 19.267$   $\mu\text{g/g}$  of iron,  $20 \pm 3$   $\mu\text{g/g}$ , for lead and  $143 \pm 20$   $\mu\text{g/g}$  of zinc. The same trend was not followed in tissues since lead and iron had higher concentration in the estuary of the river Maipo and cadmium found itself alone in the estuary Laguna de Zapallar. The antioxidant activity was higher in the estuary of the Aconcagua and oxidative damage in the estuary Laguna de Zapallar interacting with metal concentrations significantly in the tissues. In conclusion fluting bioavailable metals causing oxidative stress in *P. gualpensis*.

# Índice

1.	Introducción.....	1
1.1.	Sedimentos .....	3
1.2.	Actividades productivas.....	4
1.3.	Metales pesados .....	6
1.3.1.	Biodisponibilidad .....	8
1.4.	Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	9
1.5.	Estrés oxidativo.....	12
1.6.	Biomarcadores .....	12
1.7.	Poliquetos .....	15
2.	Planteamiento del problema.....	17
3.	Hipótesis .....	19
4.	Objetivos del estudio.....	20
4.1.	Objetivo general.....	20
4.2.	Objetivo específicos.....	20
5.	Materiales y métodos.....	21
5.1.	Diseño de muestro:.....	21
5.2.	Análisis físico-químicos de sedimentos .....	22
5.2.1.	Granulometría del sedimento .....	22
5.2.2.	Concentración de materia orgánica .....	23
5.2.3.	Potencial redox (mV), pH y demás características físico-químicas. ....	23
5.3.	Concentración de metales pesados (Díaz-Jaramillo 2013) .....	23

5.4.	Actividad enzimática .....	24
5.4.1.	CATALASA (Aebi 1984).....	24
5.4.2.	TBARS.....	24
5.4.3.	Proteínas totales.....	25
5.5.	Análisis estadístico .....	25
6.	Resultados .....	27
6.1.	Análisis físico y químico de sedimentos.....	27
6.2.	Concentración de metales .....	29
6.2.1.	Cobre .....	29
6.2.2.	Fierro.....	30
6.2.3.	Plomo.....	31
6.2.4.	Zinc.....	33
6.2.5.	Cadmio.....	34
6.3.	Actividad enzimática .....	35
6.3.1.	TBARS.....	35
6.3.2.	Catalasa.....	35
6.4.	Relación concentración de metales y actividad enzimática .....	37
7.	Discusión.....	38
7.1.	Metales y características físico químicas en sedimentos .....	38
7.2.	Actividad enzimática en Poliquetos.....	42
8.	Conclusiones.....	45
9.	Referencias bibliográficas.....	46

## Índice de Tablas

Tabla 1: Principales fuentes antrópicas de origen de los metales..	8
Tabla 2: Coordenadas geográficas de los tres estuarios estudiados.....	21
Tabla 3: Parámetros físicos y químicos medidos en los distintos estuarios. ....	27
Tabla 4: Clasificación granulométrica del sedimento.....	28
Tabla 5: Regresión simple entre concentración de metales y Tbars.....	37
Tabla 6: Regresión simple entre concentración de metales y catalasa .....	37

## Índice de Figuras

Figura 1: Clasificación física de los estuarios.....	3
Figura 2: Vías de formación de ROS, proceso de peroxidación lipídica, y los roles del glutatión y otros antioxidantes .....	11
Figura 3: Ejemplos de cómo algunas respuestas bioquímicas y fisiológicas en algunos organismos de estuarios son influenciados por inter-relaciones entre parámetros abióticos y contaminación antropogénica.....	14
Figura 4: Vista dorsal y ventral de la parte anterior del poliqueto <i>P. gualpensis</i> . ....	16
Figura 5: Puntos de muestreo seleccionados.....	22
Figura 6: Diagrama resumen de la metodología a utilizar para obtener los resultados esperados. ....	26
Figura 7: Concentración de cobre en sedimentos.....	29
Figura 8: Concentración de cobre en tejidos de <i>P.gualpensis</i> . ....	30
Figura 9: Concentración de hierro en sedimentos.....	30
Figura 10: Concentración de hierro en tejidos de <i>P.gualpensis</i> .....	31
Figura 11: Concentración de plomo en sedimentos. ....	32
Figura 12: Concentración de plomo en tejidos de <i>P.gualpensis</i> . ....	32

Figura 13: Concentración de zinc en sedimentos.....	33
Figura 14: Concentración de zinc en tejidos.....	34
Figura 15: Concentración de Cadmio en tejidos del <i>P.gulapensis</i> . ....	34
Figura 16: Concentraciones promedios de malondialdehído encontrados en los distintos estuarios. ....	35
Figura 17: Promedios de actividad de la enzima Catalasa en <i>P. gulapensis</i> en los distintos estuarios. ....	36

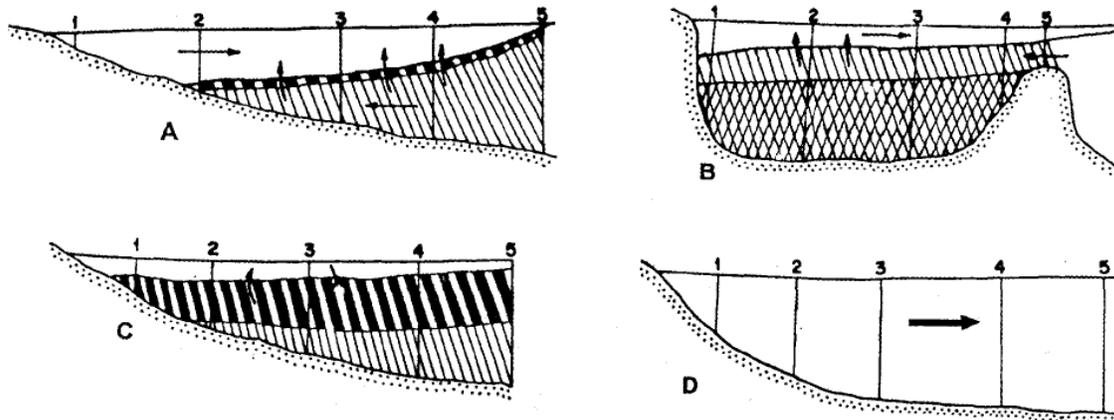
# 1.Introducción

Los estuarios son ecosistemas de alta productividad biológica, en los que se desarrollan diversas especies de invertebrados, peces y aves. La sustentabilidad de estos cuerpos de agua, para las zonas costeras, es de vital importancia, tanto por factores económicos como ecológicos. Estas zonas se encuentran altamente antropizadas con importantes actividades productivas de índole agrícola, ganadero y pesquero, entre otras. Los estuarios se caracterizan por ser zonas de acumulación de sedimentos, los que podrían contener altos niveles de agentes contaminantes generándose un potencial riesgo ambiental para los organismos que habitan estos ecosistemas (Díaz-Jaramillo, 2013).

Los estuarios se pueden presentar de diversas formas, sin embargo de manera general se les define como un cuerpo de agua costero semi-encerrado, que tiene una conexión libre con el mar abierto y dentro del cual el agua de mar es mensurablemente diluida con agua dulce derivada del drenaje terrestre (Pritchard, 1967). Otra definición utilizada es la oceanográfica, en ésta se llama estuario al tramo final de los ríos, con pequeña pendiente, que desemboca en mares afectados por el régimen de mareas (Granado, 1996). En general se caracterizan por tener una dinámica interna muy particular de sus variables químicas, físicas y biológicas, estas variables están determinadas por sus cuatro grandes componentes, caudal y escurrimiento de los ríos; entrada de agua de mar y efecto de las mareas; la roca madre del lecho y el transporte de sedimentos y la atmósfera (Stuardo & Valdovinos, 1989).

En base a su funcionamiento y su patrón de circulación, se establecieron las clasificaciones más comunes de los estuarios:

- **Cuña salina:** En estuarios en los que la descarga fluvial es elevada con respecto a la amplitud de marea, las capas de agua dulce y agua salada se encuentran bien diferenciadas y separadas por una fuente haloclina. (Fig. 1, A y b) (Piccolo & Perillo, 1997).
- **Mezcla parcial:** En estuarios donde la descarga del río no es un factor determinante. La acción de las mareas genera vórtices que introducen transportes de masa significativos (Fig. 1, c). Los estuarios de mezcla parcial son probablemente los más comunes y los de mayor distribución mundial en todos los tipos de rangos de mareas y zonas climáticas (Piccolo & Perillo, 1997).
- **Verticalmente homogéneos:** Son estuarios donde las corrientes de marea son fuertes en relación a la descarga fluvial. La mezcla turbulenta es muy importante. La columna de agua es agitada vigorosamente y tiende a una homogeneidad vertical, aunque exista gradiente longitudinal (Fig. 1, d) (Piccolo & Perillo, 1997).
- **Seccionalmente homogéneos:** Se producen por estuarios angostos y profundos. En estas condiciones la salinidad varía solamente a lo largo del eje del canal y el flujo neto está dirigido hacia el mar en todos los niveles, a una tasa equivalente a la de la descarga del río, Fig. 1d (Piccolo & Perillo, 1997).



**Figura 1:** Clasificación física de los estuarios en base al patrón de circulación del agua. A) Cuña salina; B) Fiordos; C) Mezcla parciales; D) Homogéneos (Piccolo & Perillo, 1997).

## 1.1. Sedimentos

Los sedimentos de los estuarios y de zonas costeras pueden considerarse como una mezcla de materia orgánica e inorgánica, que ha llegado al sitio de deposición como material particulado sólido o que se ha incorporado en los sedimentos de maneras diversas. Estos sedimentos pueden ser clasificados de acuerdo con su tamaño de grano, por su proporción relativa de componentes orgánicos e inorgánicos, su química predominante (silíceo o calcáreo) y la composición mineralógica (UNEP, 1995).

Los sedimentos estuarinos se derivan de diversas fuentes, destacando las fuentes fluviales, erosión de línea de costa, fuentes marinas, fuentes eólicas y fuentes biológicas. Las facies sedimentarias regulan su composición en función del tipo y cantidad del material sedimentario disponible para depositación, procesos hidrodinámicos y la geometría de la cuenca. El conjunto de estos ambientes sedimentarios, normalmente está asociado a las características de la barrera arenosa que los protege del mar, la dinámica del influjo de ríos, los que normalmente se ubican en la cabecera del sistema estuarino, la boca del estuario que comunica las aguas estuarinas con el océano y el borde somero a lo largo de la línea de costa donde ocurre la erosión litoral (Yáñez *et al.*, 2004).

La geomorfología de los ambientes costeros se ve afectada por la importancia relativa del oleaje y las mareas, debido a que éstas controlan la cantidad, naturaleza, distribución y transporte de sedimentos a lo largo de la costa. Un oleaje significativo genera transporte activo de sedimentos a lo largo de la costa, lo que produce perfiles sedimentarios paralelos de tipo “spits”, barras arenosas o islas de barrera. Por su parte las mareas significativas que están asociadas a corrientes marinas significativas producen perfiles sedimentarios normales en la costa, incluyendo bancos arenosos alargados, amplias bocas estuarinas, fuertes canales distributarios deltáicos y amplias llanuras de inundación intermareales. De esta forma se puede distinguir entre estuarios dominados por mareas y los dominados por oleaje (Yáñez *et al.*, 2004).

La actividad biológica tiene efectos importantes en la estructura de los sedimentos terrestres, marinos y estuarinos, ya que ésta puede estabilizar o desestabilizar estos ambientes. Los organismos bentónicos que ahí habitan tienen relación directa con el sustrato y a través de sus procesos biológicos pueden influir en la desestabilización de sedimentos cohesivos, afectando de forma directa la porosidad y permeabilidad de los mismos (Angeletti *et al.*, 2014).

Las zonas costeras, y en muchos casos los estuarios, son frecuentemente el depósito final de residuos orgánicos e inorgánicos derivados de las actividades industriales y urbanas que se desarrollan en su entorno. Generalmente en zonas industrializadas y portuarias, los residuos contienen una alta cantidad de metales pesados, donde los sedimentos actúan como los principales reservorios de estos metales formando una matriz compleja y heterogénea (Calderón & Valdés, 2012; Ahumada *et al.*, 2004).

## **1.2. Actividades productivas**

En Chile el crecimiento de las actividades económicas ha contribuido a mejorar la calidad de vida de las personas, observándose un aumento de la esperanza de vida, disminución

de la mortalidad infantil y disminución de la pobreza. Todo lo anterior se ve reflejado en una disminución del déficit en el Índice de Desarrollo Humano, de 39,4% del programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Aun así los niveles de desigualdad en el país siguen siendo altos (MMA, 2013).

Las actividades productivas han llevado al crecimiento del Producto interno bruto (PIB) de Chile, pero junto con los beneficios que han significado para la población (empleo, mejores sueldos, etc.), también han producido y producen diversos impactos sobre el medio ambiente, los que a su vez, generan diversos efectos en la calidad de vida de las personas (MMA, 2013).

La contaminación del aire y de cuerpos de agua; la pérdida de biodiversidad, el cambio climático, la generación de residuos, entre otros, generan problemas cuya causa directa está asociada a la actividad humana. Por esto es que resulta importante, conocer y monitorear, mediante datos e indicadores, aquellas variables que impulsan o podrían generar problemas en el medio ambiente. Para este caso de estudio se analizará el estuario del río Aconcagua y Maipo, usando como control el estuario de Laguna de Zapallar en la zona de Maitencillo.

La cuenca del río Maipo abarca prácticamente la totalidad de la Región Metropolitana. Esta Región es la que presenta la mayor concentración de población en el país, además de ser la región que tiene un mayor aporte al PIB en el país, destacando los sectores del comercio, transporte, industria manufacturera y en menor medida la minería (DGA, 2003).

El sector agrícola también presenta importancia en la región y en la zona de la cuenca más cercana al estuario del río Maipo, destacan la actividad portuaria y en menor medida la industria manufacturera (Gore, 2014; DGA, 2003).

La cuenca del río Aconcagua se encuentra en la región de Valparaíso. En la zona alta del río Aconcagua destaca la minería como actividad económica predominante y en la zona baja del río, destacan la actividad turística e industrial con la refinería de petróleo como principal industria (Gore, 2014).

La cuenca del Estero Catapilco, a la que pertenece el estuario de la Laguna de Zapallar, es bastante pequeña, ubicada en la quinta región en la zona de Maitencillo, comuna de Puchuncaví, esta cuenca destaca principalmente por la actividad turística, inmobiliaria y agrícola. A pesar de esto en las cercanías, Quintero, se encuentran ubicadas actividades de generación de energía, principalmente termoeléctricas (Gore, 2014).

### **1.3. Metales pesados**

Los metales pesados son elementos naturales que se encuentran en los ecosistemas por procesos naturales como la actividad volcánica y la erosión y por procesos antrópicos como los desechos industriales y los depósitos de aguas residuales. El incremento progresivo en sus concentraciones provoca problemas en zonas costeras, lagos y ríos debido a su persistencia y toxicidad en bajas concentraciones (Boada *et al.*, 2007).

Algunos metales en pequeñas cantidades son esenciales para los organismos, como el Fe, Mn, Zn, B, Co, As, Cu, Ni y Mo, pero estos se convierten en nocivos cuando se presentan en concentraciones elevadas. También existen otros metales que no presentan ninguna función biológica y tienen un efecto sumamente tóxico, como son: Cd, Hg o Pb. Estos metales cuando están presentes y además presentan niveles altos de biodisponibilidad, no solo generan aumento en los niveles de toxicidad, también constituyen potenciales riesgos al incorporarse por la cadena trófica (Alcalá *et al.*, 2009).

A menudo resulta difícil determinar si las concentraciones de metales presentes en los sedimentos representan condiciones de enriquecimiento natural o antropogénico, debido

a que el contenido natural de los metales en el sedimento puede variar dependiendo de la mineralogía, contenido de materia orgánica y distribución del tamaño de grano (Márquez *et al.*, 2008). Los principales orígenes antrópicos de los metales pesados se muestran en la tabla 1.

La caracterización de los factores que afectan a la biodisponibilidad, lixiviación y toxicidad de los metales en el suelo es de suma importancia. Los metales son componentes naturales importantes de todos los suelos en los que su presencia en la fracción mineral comprende una gama de especies potencialmente móviles, como importantes componentes de arcillas y minerales, teniendo influencia en la geoquímica de los suelos. Los metales también están presentes en la fracción orgánica, con frecuencia como formas unidas y como reciclaje de metal, que ocurre por la descomposición de materia orgánica (Alcalá *et al.*, 2009).

En los resultados de este trabajo se mostrarán las concentraciones de cinco metales (cobre, plomo, zinc, cadmio y fierro) en sedimentos y en tejidos del poliqueto *P. gualpensis* presente en los estuarios del río Maipo, Aconcagua y Laguna de Zapallar. Además se evaluará la actividad enzimática en el poliqueto y su relación con la presencia de metales pesados.

**Tabla 1:** Principales fuentes antrópicas de origen de los metales. (Rojas, 2011)

Origen	Sb	As	Cd	Cu	Cr	Hg	Ni	Pb	Zn
Baterías eléctricas			*	*			*	*	
Cementos y amiantos					*				
Chapados metálicos					*				
Curtidos metálicos				*	*				
Curtidos de pieles				*	*				
Eléctrica y electrónica			*	*	*		*	*	*
Farmacéuticas		*		*	*				*
Fertilizantes		*	*	*	*	*	*	*	*
Fotografía			*	*	*			*	
Fundiciones		*	*	*	*		*	*	*
Galvanizados y electrochapados			*	*	*		*	*	*
Minería	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Motores de Vehículos, chapados de aviones			*	*	*				*
municiones y explosivos				*	*			*	
Papeleras y similares				*	*		*	*	*
Pesticidas		*		*	*	*		*	*
Pigmentos, tintes, tintas, pinturas	*		*	*	*		*	*	*
Plásticos	*		*		*				*
Químicas, Petroquímica	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Textiles	*			*	*				*
Vitrocerámica			*				*	*	

### 1.3.1. Biodisponibilidad

La biodisponibilidad es la concentración de metal libre y lábil, presente en un ecosistema. La biodisponibilidad de los metales en los sedimentos tiene un efecto directo sobre los organismos, muchos de los cuales acumulan altas concentraciones con efectos crónicos para su población, siempre que este elemento esté libre para ser captado y así pueda ejercer su toxicidad (Vullo, 2003; Acosta *et al.*, 2002).

La biodisponibilidad de los metales está relacionada con las características fisicoquímicas del ambiente, que determinan su especiación y por lo tanto la concentración del metal libre.

Las principales variables que determinan la concentración de metales son el potencial redox, granulometría, concentración de coloides y la concentración de carbono orgánico, sulfuros y materia orgánica (Rojas, 2011).

Todos los metales, incluyendo los macronutrientes esenciales, son virtualmente tóxicos para los organismos siempre que los niveles de exposición sean lo suficientemente altos. Un exceso de concentración de iones de metales pesados puede causar la generación de especies reactivas de oxígeno. Además algunos metales se unen a enzimas y proteínas específicas compitiendo con otras sustancias que resultan esenciales para el mantenimiento y funcionamiento celular. Es por esto que los organismos han desarrollado diversos sistemas de regulación activa de la absorción de metales, como la distribución, el metabolismo y las excreciones (Govind & Madhuri, 2014; Jara *et al.*, 2014; Gaete *et al.*, 2007; Scelzo, 1997).

## **1.4. Especies reactivas del oxígeno (ROS)**

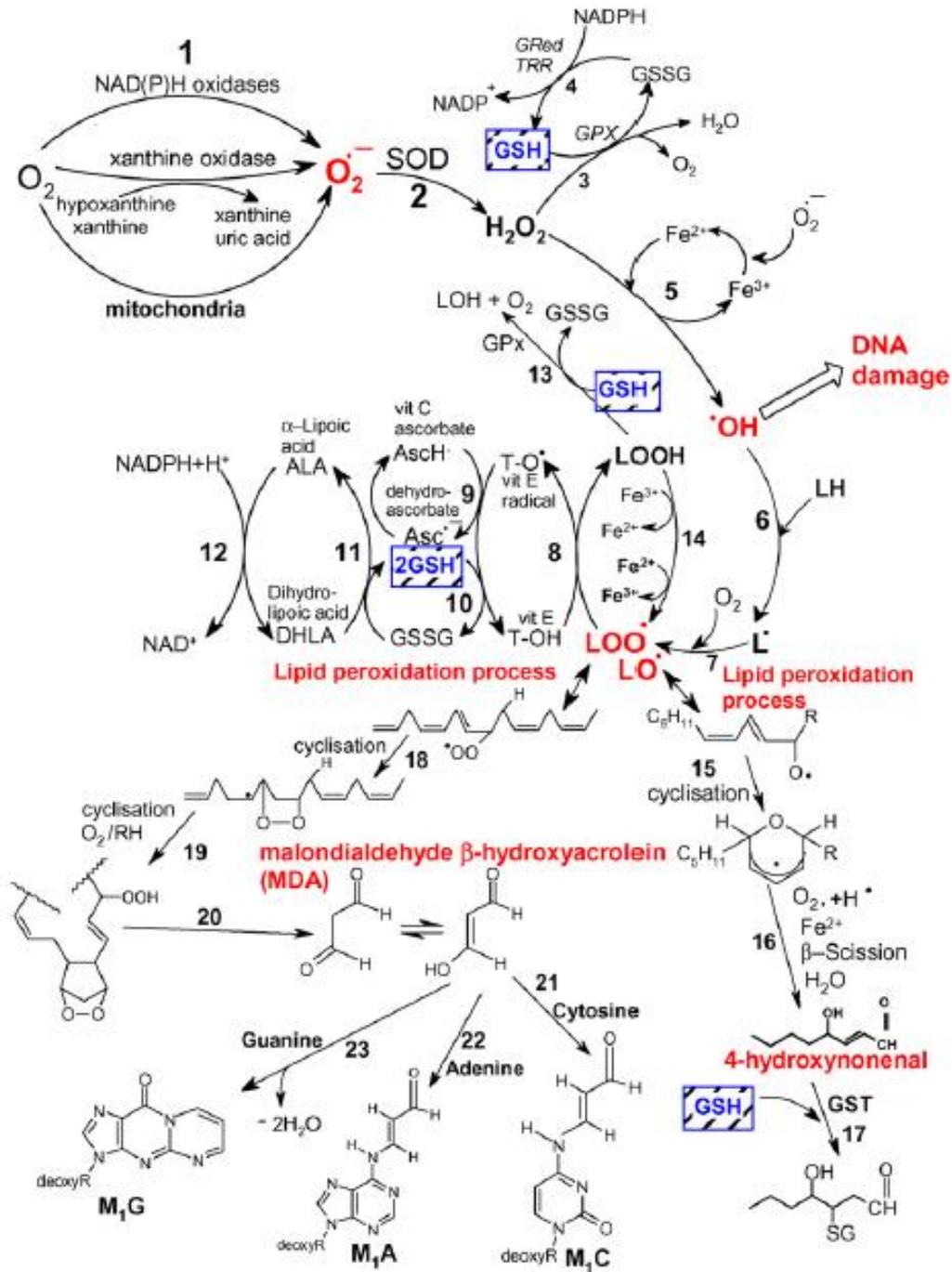
Los radicales libres son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales atómicos o moleculares. Estos electrones desapareados normalmente tienen un considerable grado de reacción con los radicales libres, siendo los radicales derivados del oxígeno la clase de radicales más representativa en los sistemas de vida (Repetto J. & Repetto K., 2009; Valko *et al.*, 2007; Céspedes *et al.*, 1996).

La molécula de oxígeno ( $O_2$ ) tiene solo una configuración electrónica, lo que por sí mismo es un radical. Cuando se le agrega un electrón se forma el anión radical superóxido ( $O_2^-$ ), que es considerado el ROS “primario” ya sea originado por radiación o por procesos

metabólicos, y puede promover interacciones con otras moléculas para generar ROS secundarios, ya sea directamente o prevalentemente a través de procesos catalizados por enzimas o metales, como se muestra en la figura 3 (Valko *et al.*, 2007).

Las principales ROS son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) (Céspedes *et al.*, 1996).

Las especies reactivas del oxígeno juegan un doble papel a nivel celular, ya que a bajas y moderadas concentraciones pueden ser beneficiosas, ayudando, por ejemplo, a la defensa contra agentes infecciosos o induciendo a respuestas mitogénicas entre otros. Por el contrario el exceso de ROS puede producir estrés oxidativo (Jara *et al.*, 2014; Valko *et al.*, 2007).



**Figura 2:** Vías de formación de ROS, proceso de peroxidación lipídica, y los roles del glutatión y otros antioxidantes con el fin de controlar el estrés oxidativo (Valko *et al.*, 2007).

## **1.5. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se puede definir como una situación de desequilibrio entre la producción de moléculas oxidantes y antioxidantes, generando o dando como resultado una mayor cantidad de moléculas oxidantes (Leyton *et al.*, 2015; Jara *et al.*, 2014).

La primera línea de defensa contra los agentes oxidantes, es la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta elimina el anión radical superóxido, por medio de la catálisis de la dismutasa generando  $H_2O_2$ . Con el fin de evitar la reacción entre el  $H_2O_2$  y algún metal de transición, la enzima catalasa cataliza la transformación de esta molécula en dos de agua y una de  $O_2$  (Jara *et al.*, 2014).

El Malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación lipídica, por lo que como reflejo de esto es un importante indicador de estrés oxidativo a nivel de membrana celular.

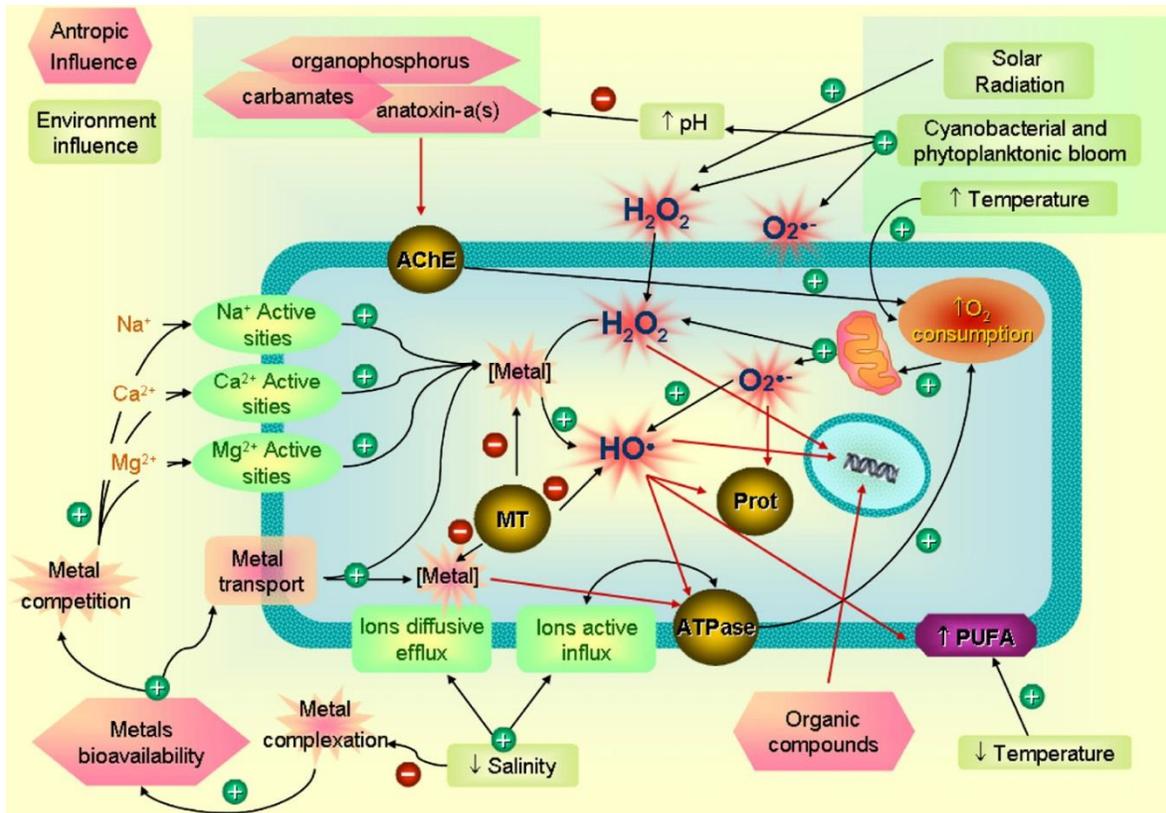
## **1.6. Biomarcadores**

Los biomarcadores son respuestas o alteraciones bioquímicas, morfológicas y fisiológicas de los organismos producidas por su exposición a contaminantes (Rendón, 2005). La diferencia con los bioindicadores es que estas respuestas son medidas en organismos y comunidades, en cambio los bioindicadores miden las respuestas en cualquier nivel de organización biológica. Las dos características más importantes de los biomarcadores son que pueden identificar las interacciones entre el contaminante y el organismo y que se pueden medir efectos sub-letales (Bozo *et al.*, 2007).

Las razones para usar un biomarcador y no medir la contaminación en forma directa en los sedimentos, son: a) que estos proveen una medida integrada de la biodisponibilidad de los contaminantes en el tiempo; b) los biomarcadores son el reflejo de la exposición a los contaminantes, por lo que al comprender los mecanismos involucrados permiten conocer su causalidad; c) pueden ayudar a reconocer las diferentes rutas de exposición, contribuyendo así a fijar las prioridades en monitoreo y a sugerir estrategias para la intervención o remediación, por lo que la medición de estos biomarcadores se ha vuelto de suma importancia en los estudios ambientales (Bozo *et al.*, 2007; Monserrat *et al.*, 2007).

En los organismos existen sistemas de defensa al estrés oxidativo, éstos están formados por enzimas y compuestos de bajo peso molecular. De las enzimas que intervienen en la protección y en el mantenimiento del balance oxidante/antioxidante, se pueden usar como biomarcadores la catalasa y el MDA (Céspedes *et al.*, 1996).

En los estuarios la variabilidad en los parámetros abióticos, pueden afectar de diversas formas las respuestas bioquímicas y fisiológicas de los organismos, como se muestra en la figura 3 en la que se observan algunas de las posibles interacciones entre factores bióticos y abióticos, algunos de los cuales pueden ser medidos y usados como biomarcadores (Monserrat *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Ejemplos de cómo algunas respuestas bioquímicas y fisiológicas en algunos organismos de estuarios son influenciados por inter-relaciones entre parámetros abióticos y contaminación antropogénica. Los símbolos (+) y (-) en las flechas negras muestran la influencia de factores bioquímicos, fisiológicos o ambientales sobre variables bióticas y abióticas. Flechas rojas indican efectos dañinos de contaminantes u otras especies químicas en moléculas marcadoras (Montserrat *et al.*, 2007).

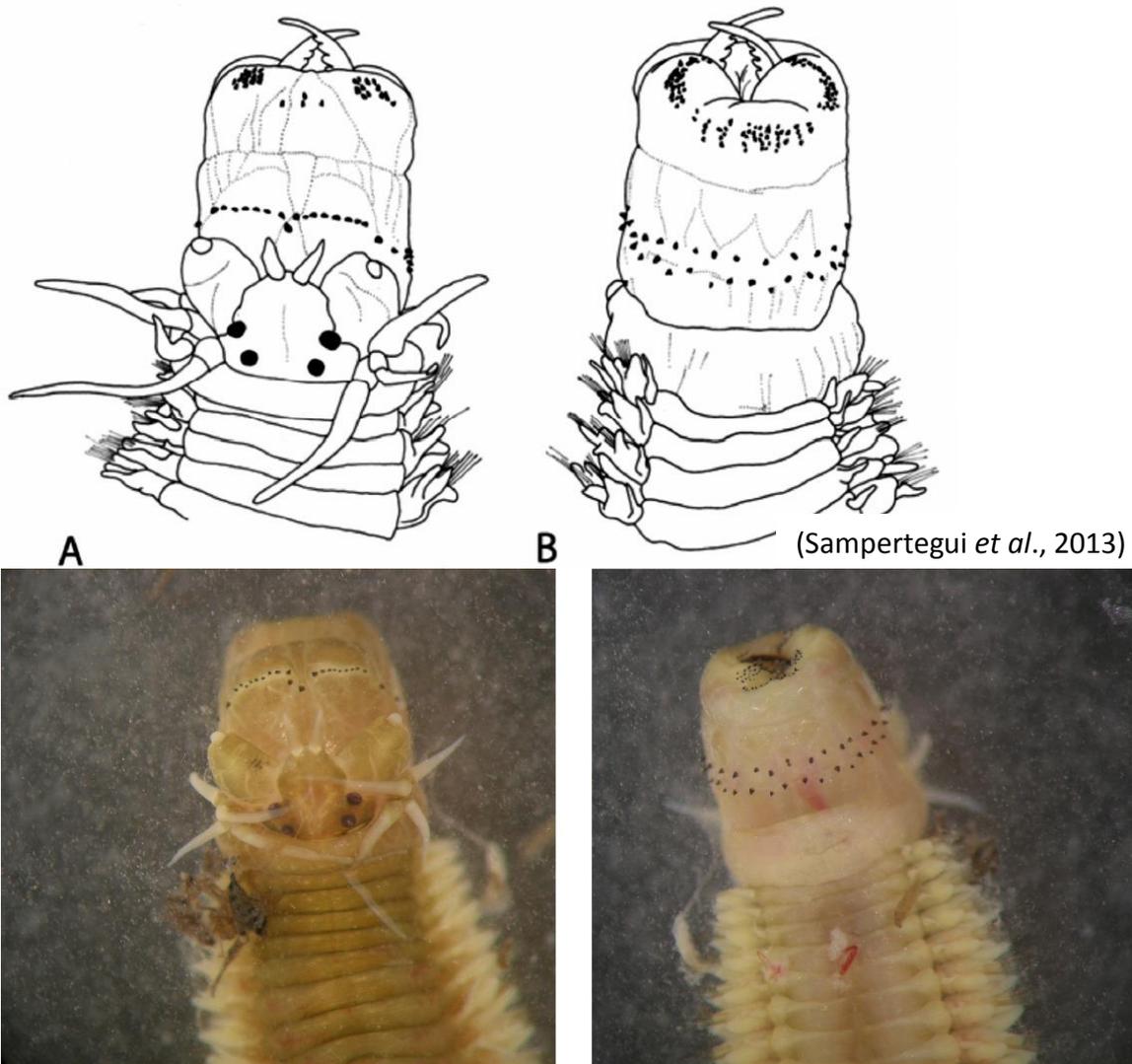
## 1.7. Poliquetos

Las comunidades bentónicas se han utilizado para estudios de contaminación debido principalmente a su baja movilidad, y por lo tanto a su capacidad de adaptarse, tolerar o morir debido a la presencia de un contaminante (Kuk Dzul *et al.*, 2006). Los poliquetos han sido utilizados como material biológico en bioensayos a nivel larval o utilizando cepas de individuos adultos, o como indicadores de bioacumulación, del estado de contaminación de comunidades submareales de fondos blandos (Cañete, 2000).

Los poliquetos son gusanos segmentados provistos típicamente, de un par de expansiones laterales de la pared del cuerpo, llamadas parapodios, que llevan numerosas cerdas quitinosas polimorfos. Son una clase del phylum Annelida, con unas 15000 especies nominales descritas. El cuerpo de los poliquetos presenta 2 variantes básicas: en una los segmentos se parecen entre sí (homómeros), mientras que en la otra, pueden distinguirse en 2 o más regiones (heterómeros), como se observa en la imagen 1. En ambos casos en el extremo anterior puede mostrar mucha variación, desarrollo variable de los ojos, antenas, palpos, cirros tentaculares y branquias, de modo que pueden transformarse en una serie de apéndices (Tovar-Hernández *et al.*, 2014).

La mayoría de estas especies viven en ambientes marinos, algunas ocupan aguas salobres y unas pocas viven en agua dulce. A pesar de que la mayoría de las especies en su estado larval son planctónicas, la gran mayoría de las especies adultas son bentónicas y unas pocas son holoplanctónicas.

En este estudio se usará la especie *Perinereis gualpensis* (figura 4), que es un poliqueto endémico de Chile, que habita en estuarios con salinidad superficial entre 2,4 (aguas mixto oligohalinas) y 34 (aguas euhalinas). Se encuentra en zonas intermareales y submareales con mayor proporción de arena fangosa y en estuarios con predominancia de limo y arcilla (Sampertegui *et al.*, 2013).



**Figura 4:** Vista dorsal y ventral de la parte anterior del poliqueto *P. gualpensis*.

## 2. Planteamiento del problema

Los estuarios son uno de los ecosistemas más estudiados a nivel mundial, excepto en Chile. La variedad de problemas que se destacan para priorizar el estudio de estos ecosistemas, desde distintos puntos de vista, son: el dinámico (interacción de factores hidrológicos y oceanográficos), el físico-químico (mezclas de aguas dulces y saladas), el sedimentológico (depósitos de fangos, embancamientos), el biológico, el punto de vista económico, ya que en muchos estuarios se asientan puertos fluviales o marinos, además de estar sujetos a explotaciones económicas y también el punto de vista ambiental debido a la gran cantidad de biodiversidad presente en los estuarios (Díaz-Jaramillo, 2013; Martínez C & Cortez C., 2007).

En algunas zonas estuarinas se presenta una alta actividad industrial, debido a que se caracterizan por tener suelos con escasa pendiente, presencia de agua en sus proximidades y cercanía al mar, condiciones ideales para la instalación de industrias. Esto ha resultado en que algunos estuarios estén sometidos a fuertes impactos generados por la intensa contaminación ya sea orgánica o inorgánica producida por las actividades allí realizadas (Venkatramanan *et al.*, 2015; Luque *et al.*, 1998).

Entre los elementos que al estar presente en los sedimentos estuarinos intermareales producen mayor contaminación se encuentran los metales pesados, como son el plomo, cobre, zinc, fierro y cadmio. Estos elementos afectan a los organismos, produciendo bioacumulación, debido a su incorporación a través de las cadenas tróficas locales, también producen problemas al sistema inmune, daños a nivel celular y estrés oxidativo, que consiste en un desequilibrio en el sistema de defensa antioxidante de los organismos, al producirse un mayor número de radicales libres (Alcalá *et al.*, 2009; Eróstegui, 2009; Valko *et al.*, 2007).

Los estuarios estudiados en esta investigación presentan actividades económicas en las cercanías. Para el caso del estuario del río Maipo, destacan en las zonas costeras de San Antonio una gran actividad portuaria, además de presentarse una pequeña actividad industrial, principalmente industria del cemento, y agricultura en las cercanías al estuario (GORE, 2014), además hay que tomar en cuenta que el río Maipo atraviesa gran parte de la Región Metropolitana. En la zona baja del estuario del río Aconcagua, se encuentra una refinería de petróleo, y en la zona alta de la cuenca de este río, se presenta una gran actividad minera, la que es reemplazada por actividad agrícola en las zonas media más baja de la cuenca (GORE, 2014; DGA, 2003). El estuario usado como control es la Laguna de Zapallar, ya que presenta una menor actividad en las cercanías, mostrando principalmente actividades turísticas y no mostrando mayor actividad industrial en la cuenca del estero Catapilco. También a estas actividades hay que sumarle una de las características principales que tienen los estuarios, como es la de ser el último receptor de sedimentos, presentando una acumulación de los contaminantes producidos por las actividades en las partes más altas de la cuenca que les corresponda.

### **3. Hipótesis**

- Los sedimentos estuarinos intermareales de los ríos Maipo, Aconcagua y de Laguna de Zapallar contienen agentes químicos, principalmente metales, en concentraciones biodisponibles que se relacionan con la actividad antioxidante y daño oxidativo en *P. gualpensis*.

## 4. Objetivos del estudio

### 4.1. Objetivo general

- Evaluar el estrés oxidativo en el poliqueto *Perinereis gualpensis* presente en sedimentos estuarinos intermareales de la zona central de Chile.

### 4.2. Objetivo específicos

- Caracterizar física y químicamente los sedimentos de los estuarios del río Maipo, Aconcagua y de la Laguna de Zapallar.
- Determinar las concentraciones de cobre, zinc, plomo, cadmio y fierro en tejido de *P. gualpensis* colectados en los estuarios.
- Determinar la actividad antioxidante y daño oxidativo en el poliqueto *P. gualpensis*.
- Relacionar la actividad antioxidante y daño oxidativo con las características químicas de los sedimentos.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Diseño de muestro:

Las muestras fueron tomadas en los estuarios del río Maipo, Aconcagua y Laguna de Zapallar (figura 5), durante la primavera del 2015, recolectando las muestras a lo largo del estuario como se muestra en la tabla 2.

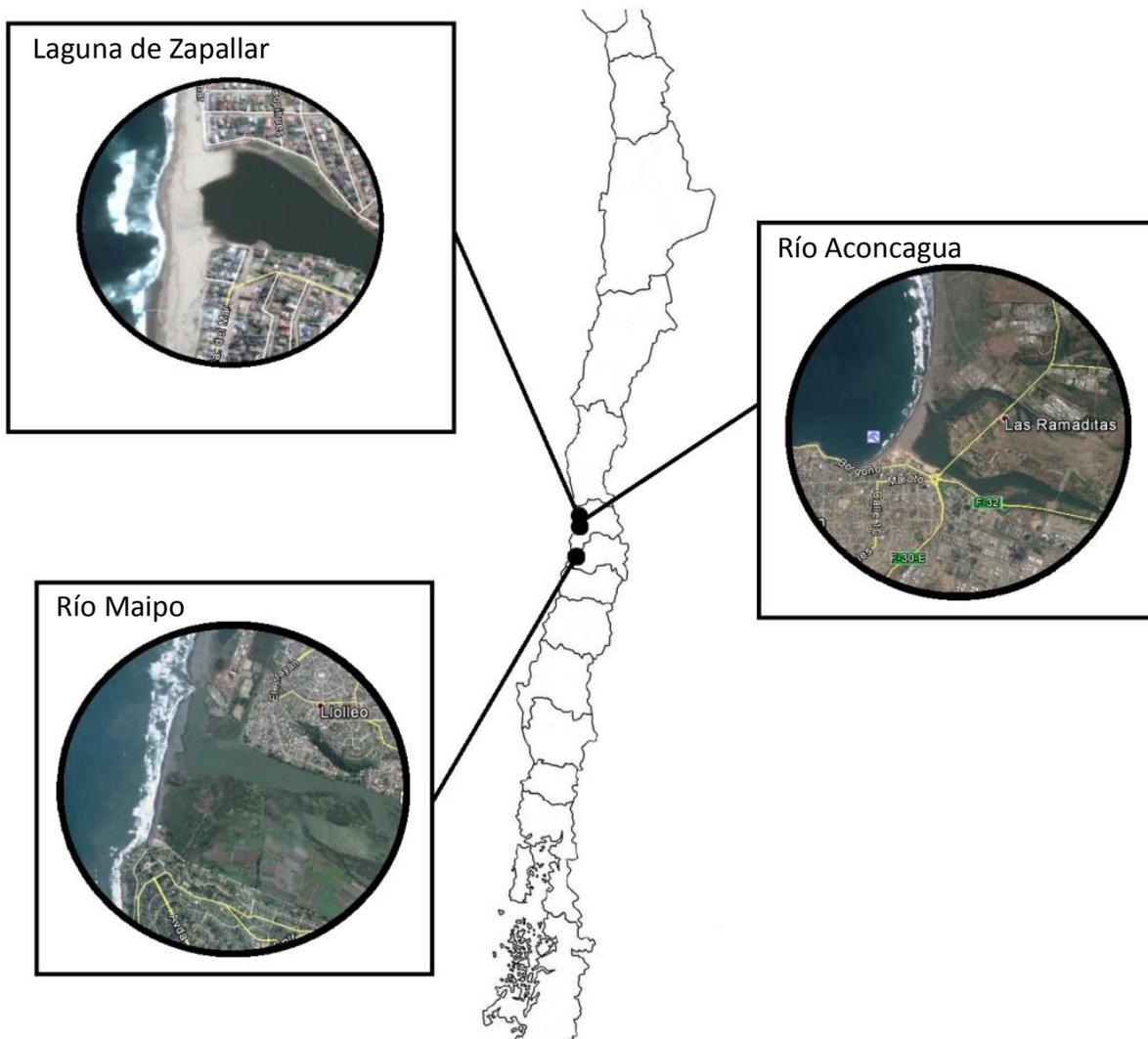
Los sedimentos fueron recolectados con una draga o también se extrajeron con palas, y guardados en recipientes de plástico, para ser congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Díaz-Jaramillo *et al.*, 2010).

En el caso de los poliquetos, se extrajeron sedimentos con una pala y fueron cernidos en un tamiz de 500 micras para una selección manual de los poliquetos, que posteriormente fueron almacenados en recipientes de plástico, para su lavado, pesado y congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La identificación de la especie fue confirmada con la publicación de Sampertegui *et al.* (2013), comparando la anatomía de las especies extraídas con las características físicas del poliqueto *P. gualpensis* observadas en esta.

**Tabla 2:** Coordenadas geográficas de los tres estuarios estudiados

	Aconcagua	Maipo	Zapallar
Sur	32°55'3.66"	33°37'8.57"	35°37'53.74"
Oeste	71°30'28.26"	71°37'45.40"	71°25'44.89"



**Figura 5:** Puntos de muestreo seleccionados en los estuarios del río Maipo, Aconcagua y Laguna de Zapallar.

## 5.2. Análisis físico-químicos de sedimentos

### 5.2.1. Granulometría del sedimento

Se determinó el tamaño de grano del sedimento en cada estación utilizando un agitador magnético con 6 tamices con diámetros de apertura de 4000  $\mu\text{m}$  (5, N° según norma ASTM)  $\mu\text{m}$  para conchuela y grava, 2000 (10) para arena medianamente gruesa, 1000 (12)  $\mu\text{m}$  para arena gruesa, 500 (35)  $\mu\text{m}$  para arena media, 250  $\mu\text{m}$  (60) para arena fina, 125 (120) para arena medianamente fina y 63 (230)  $\mu\text{m}$  para limo grueso. Las muestras se

secaron en una estufa Memmert a 50°C para luego tamizarlas en un agitador mecánico JEL 4188 por 15 minutos. Los sedimentos se clasificaron con respecto al tamaño de grano de acuerdo a la escala de Folk & Ward (Blott & Pye 2001). La escala de tamaños se ajustó en relación a los resultados granulométricos obtenidos.

### **5.2.2. Concentración de materia orgánica**

También se cuantificó la materia orgánica total presente en los sedimentos de los distintos estuarios, esto se hizo secando el sedimento, una vez seco se pesó el sedimento, considerando tanto la materia orgánica como inorgánica presente en la muestra, la que tras ser calcinada, en una mufla por 4 horas a 500°C, solo conservará la materia inorgánica, la que al ser pesada nuevamente permitirá cuantificar la materia orgánica presente. Método de Byers *et al* (1978).

### **5.2.3. Potencial redox (mV), pH y demás características físico-químicas.**

Se utilizó un electrodo Mettler Toledo para medir el potencial Redox (mV) y el pH *in situ* en el agua superficial y en el estrato superior de la columna de sedimento de una muestra no perturbada, obtenida con un recipiente de plástico. Para el resto de las características físico químicas se utilizó un medidor de pH y conductividad marca Hanna HI-98130 en la columna de agua.

## **5.3. Concentración de metales pesados (Díaz-Jaramillo 2013)**

La concentración total de metales en tejidos biológicos se realizó utilizando aproximadamente 0,6 mg de tejidos por muestra, éstos fueron previamente secados en un horno por 3 días a una temperatura de 60°C. Tras realizar ese procedimiento los tejidos fueron macerados para pre-digerirlos con 10 ml de HNO<sub>3</sub> y 5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su posterior digestión mediante una placa calefactora por 2 horas 30 minutos y la posterior agregación

de  $\text{HClO}_4$ . Una vez realizada la digestión se procedió a la cuantificación de los 5 metales seleccionados usando espectrofotometría de absorción atómica. Como control de calidad de las concentraciones se usó como material de referencia certificado, sedimentos estuarinos ERM–CC580.

El procedimiento para la cuantificación de metales en sedimentos se hizo siguiendo un método similar al antes mencionado para poliquetos. Los sedimentos fueron secados y tamizados en un tamiz de 0,5 mm para proceder a su pre-digestión agregándoles 2 ml de  $\text{HNO}_3$ , 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 2 ml de  $\text{HCl}$  tras lo que se realizó la digestión en un microondas milistore Ethos Easy (siguiendo un programa de digestión de sedimentos del digestor) y el posterior llevado al espectrofotómetro de emisión atómica.

## **5.4. Actividad enzimática**

### **5.4.1. CATALASA (Aebi 1984)**

Para la determinación de la catalasa se siguió la metodología descrita por Aebi (1984), a la que se le hicieron algunos ajustes en las concentraciones. Mediante un espectrofotómetro (siguiendo la degradación del peróxido de hidrogeno cada 15 segundos por un minuto 30 segundos a 240 nm) se determinó la actividad de la enzima. La solución medida consistía en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 M, 2,85 ml de buffer de pH 7,5 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM) y 50  $\mu\text{l}$  de hemolizado de la muestra. Además se utilizó un blanco de 3 ml del buffer. Los resultados serán expresados en Unidades de enzima/mg proteína (Jara *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2012; Gaete *et al.*, 2010).

### **5.4.2. TBARS**

Para determinar la producción TBARS se midió la producción de aldehídos producidos por la lipoperoxidación, siendo el más abundante el malondialdehído (MDA). Estos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico generando compuestos coloreados los que se pueden medir

usando espectrofotometría óptica en la región visible del espectro con un peak de absorción a 525 nm.

La muestra se centrifugó con 2 ml de ácido tricloroacético (30%) por 15 minutos a 3000 rpm. Una vez centrifugado se extrajeron 1,5 ml de sobrenadante a los que se le agregó 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0,67%) y ésta solución se calentó a 100°C por 20 minutos, para su posterior medición en espectrofotómetro (realizando un barrido por el espectro de 400 a 600 nm). Los datos obtenidos se expresaran en nano moles de MDA/ ml calculados mediante curva de calibración obtenida con MDA puro (Jara *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2012; Gaete *et al.*, 2010).

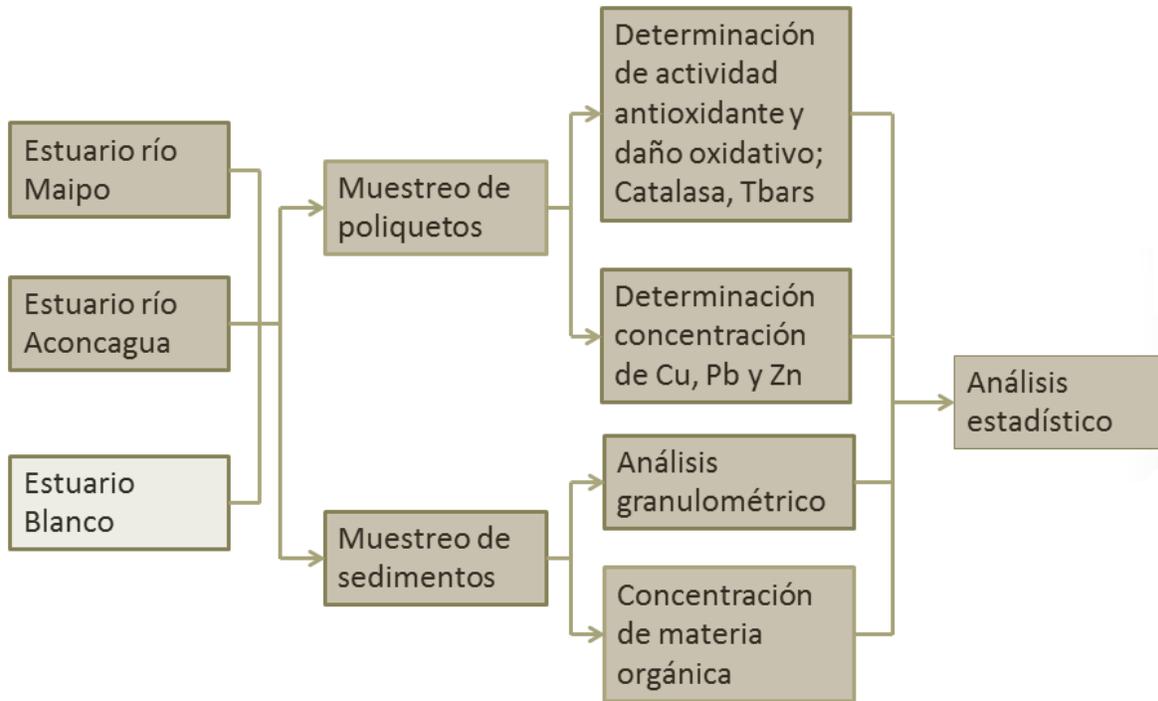
### **5.4.3. Proteínas totales**

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó, siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951), usando cobre alcalino ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,94 M,  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ,  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{NaOH}$ ), Folin-ciocalteau (1:20 en agua destilada) y una dilución (1:10) de sobrenadante, tras centrifugar la muestra. La mezcla se incubará a 55°C por 5 minutos para su posterior lectura en un espectrofotómetro a 650 nm (Jara *et al.*, 2014).

## **5.5. Análisis estadístico**

Para el análisis e interpretación de los parámetros obtenidos se realizó un análisis de varianza (Kruskal Wallis) para el caso de la actividad enzimática, utilizando un software computacional (STATISTICA 7). Cuando la diferencia fue significativa se le realizó un análisis de Tukey al 5% de significancia. Para las concentraciones de metales se usó un análisis Anova de una vía (Díaz Jaramillo *et al.*, 2013; Gaete *et al.*, 2010).

Toda la metodología descrita en este capítulo se resume en la figura 6, mostrando en términos generales, desde el muestreo inicial en los distintos estuarios hasta los resultados finales y el análisis estadístico.



**Figura 6:** Diagrama resumen de la metodología a utilizar para obtener los resultados esperados.

## 6. Resultados

### 6.1. Análisis físico y químico de sedimentos

Los parámetros físico-químicos medidos en los tres estuarios se muestran en la tabla 3, correspondiendo los 3 primeros a parámetros medidos en el agua y los dos últimos, correspondientes al potencial de óxido-reducción (ORP) y temperatura medidos directamente a los sedimentos.

**Tabla 3:** Parámetros físicos y químicos medidos en los distintos estuarios.

	Sólidos disueltos totales (ppm)	pH	Conductividad (mS)	Temperatura (°C)	Potencial oxido reducción (mV)	Contenido materia orgánica (%)
<b>Aconcagua</b>	2e-7	7,84	0,40	18,10	394	1,95±0,06
<b>Maipo</b>	1.1e-7	8,15	1,22	23,00	130	2,09±0,07
<b>Zapallar</b>	6e-6	8,70	12,16	20,80	375	2,00±0,30

En relación a la distribución granulométrica analizada en los distintos estuarios, se observó que en los tres estuarios el mayor porcentaje de sedimentos corresponde a arena, siendo la concentración más alta en Zapallar con un 96,2% y la más baja en el Maipo con un 50,9% (tabla 4).

La composición granulométrica en el estuario del río Aconcagua es mayoritariamente de arena muy fina, en el río Maipo predomina el limo grueso, siendo en estos dos estuarios predominante granulometría más pequeña (desde arena media hacia tamaños menores), a diferencia de Zapallar que presenta conchuela (mayor tamaño medido) y la mayor fracción correspondió a arena gruesa, tal como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4:** Clasificación granulométrica del sedimento. Udden (1914) - Wentworth (1922).

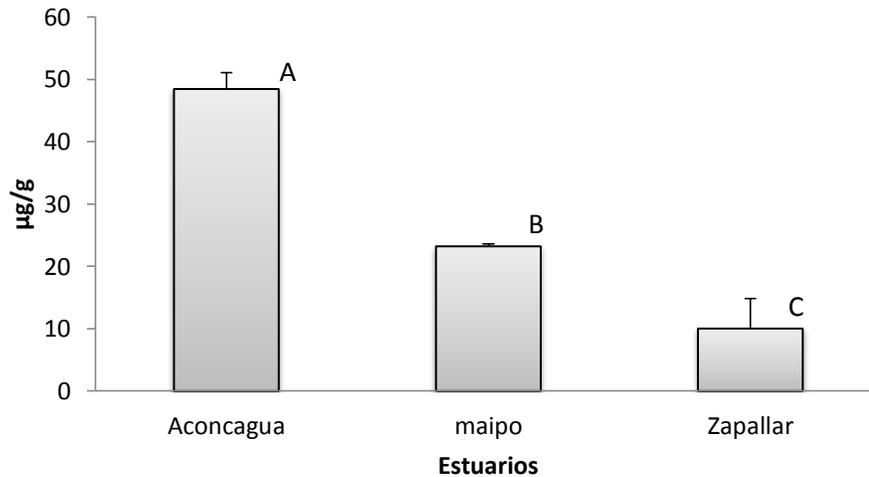
	Clasificación	Apertura (micrones)	Phi	A	M	Z
<b>Distribución granulométrica</b>	<b>% Grava</b>			0.0	0.0	3.8
	<b>% Arena</b>			81.1	50.9	96.2
	<b>% Limo grueso</b>			18.9	49.1	0.0
<b>Composición granulométrica</b>	<b>% CONCH</b>	4000	<b>-1</b>	0,0	0,0	3,8
	<b>% AMG</b>	2000	<b>0</b>	0,0	0,0	23,3
	<b>% AG</b>	1000	<b>1</b>	0,0	0,0	61,8
	<b>% AM</b>	500	<b>2</b>	4,7	21,9	4,7
	<b>% AF</b>	250	<b>3</b>	1,7	23,1	4,2
	<b>% AMF</b>	125	<b>4</b>	74,7	5,9	2,2
	<b>% LG</b>	63	<b>5</b>	18,9	49,1	0,0

CONCH: conchuela, AMG: Arena muy gruesa, AG: Arena gruesa, AM: Arena media AF: Arena fina, AMF: Arena muy fina LG: Limo grueso, A (Aconcagua), M (Maipo), Z (Zapallar).

## 6.2. Concentración de metales

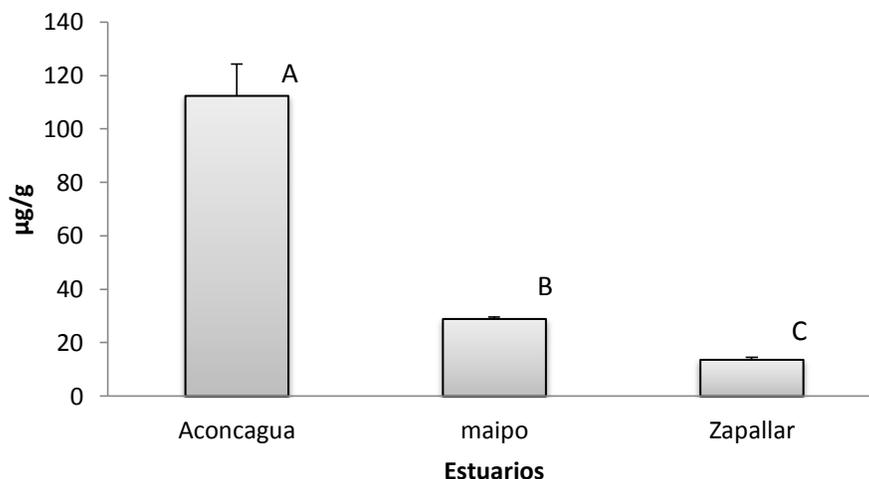
### 6.2.1. Cobre

Al analizar la presencia de cobre en los sedimentos de los estuarios, se observó que la mayor concentración estaba presente en el estuario del Río Aconcagua siendo  $48 \pm 2 \mu\text{g/g}$  y la menor concentración se encontró en Zapallar con  $10 \pm 5 \mu\text{g/g}$  (figura 7). Para el caso del Maipo esta fue  $23,2 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ . Se registraron entre los 3 estuarios diferencias significativas.



**Figura 7:** Concentración de cobre en sedimentos. Letras distintas indican diferencias significativas entre los estuarios ( $p < 0.05$ ) ( $n=3$ ).

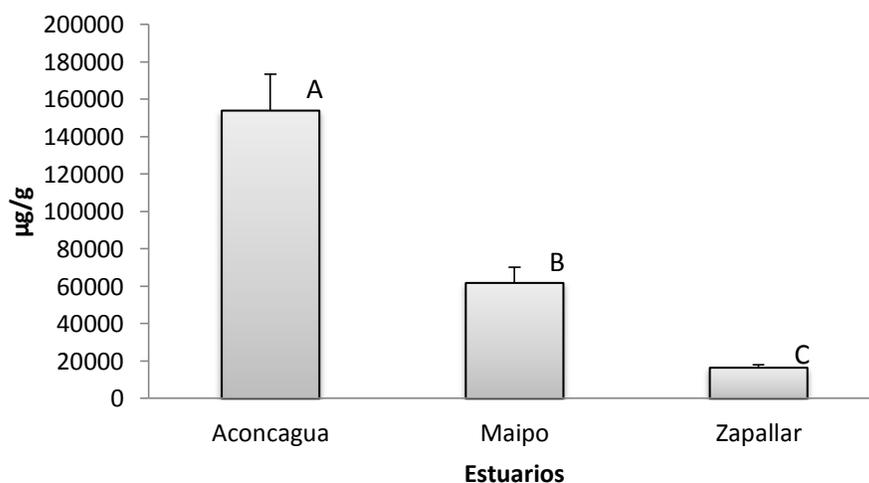
La concentración de cobre en los tejidos del *P. gualpensis*, seguía un orden de magnitud similar al de los sedimentos, siendo la mayor en el Río Aconcagua con  $111 \pm 12 \mu\text{g/g}$  y la menor en Zapallar con  $13,6 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$ . El Maipo presentó una concentración de  $28,9 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$  de cobre (figura 8). Todos los estuarios mostraron concentraciones estadísticamente distintas de cobre.



**Figura 8:** Concentración de cobre en tejidos de *P.gualpensis*. Letras distintas indican que son diferentes estadísticamente. ( $P < 0,05$  y  $n=4$ )

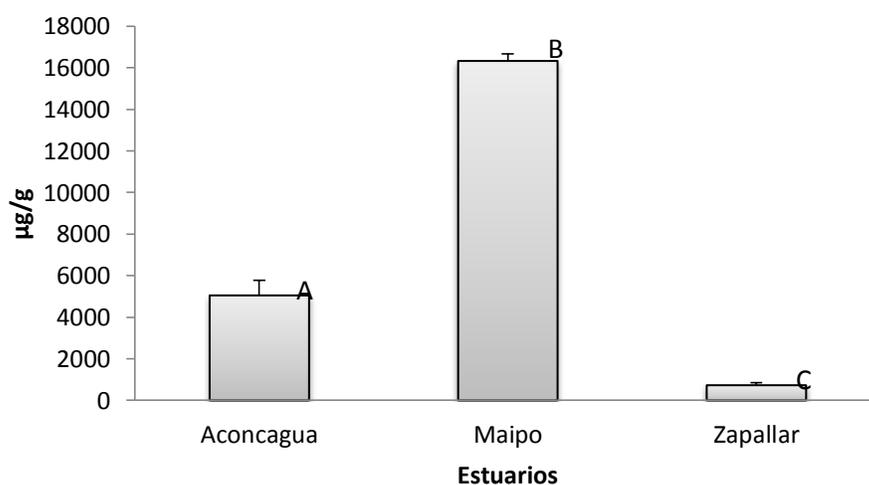
### 6.2.2. Hierro

En la figura 9 se observa la concentración de hierro en sedimentos, donde la mayor concentración se encontró en el río Aconcagua,  $153.970 \pm 19.267$  µg/g, seguido del río Maipo con  $61.808 \pm 8.246$  µg/g y la más baja de  $16.471 \pm 1.542$  µg/g, correspondió a Laguna de Zapallar, en este caso al igual que en el anterior análisis de sedimentos, las diferencias significativas se encontraron en los tres estuarios analizados.



**Figura 9:** Concentración de hierro en sedimentos. Letras diferentes muestran que los estuarios son significativamente distintos ( $p < 0,05$  y  $n=3$ ).

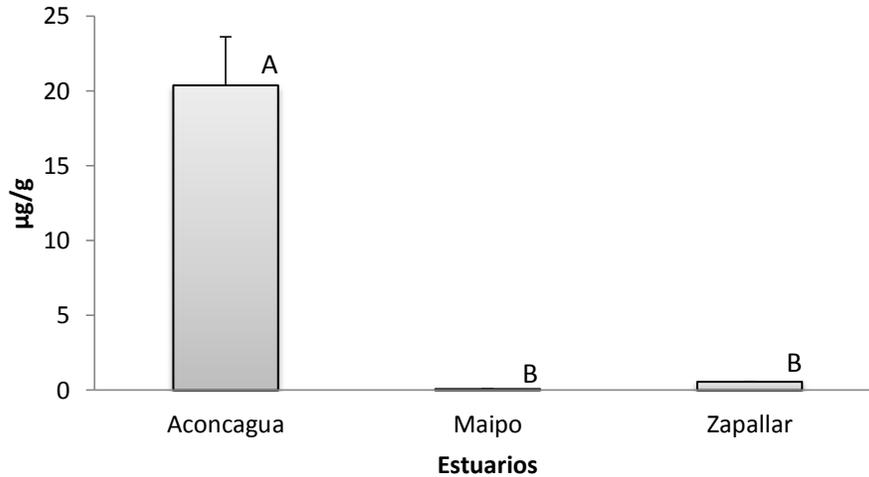
Para el caso de los tejidos en muestras de *P.gualpensis*, las concentraciones de hierro no siguieron el mismo patrón que en los sedimentos, ya que este metal mostró su mayor concentración en los tejidos del estuario del Maipo,  $16.335 \pm 333 \mu\text{g/g}$  y su menor concentración en la Laguna de Zapallar con  $727 \pm 115 \mu\text{g/g}$ , para el estuario del río Aconcagua la concentración fue de  $5.050 \pm 724 \mu\text{g/g}$  (figura 10). Al igual que en los sedimentos las diferencias significativas se encontraron en los tres estuarios con  $p < 0,05$  y  $n=4$ .



**Figura 10:** Concentración de hierro en tejidos de *P.gualpensis*. Letras diferentes muestran que los estuarios son significativamente distintos ( $p < 0,05$  y  $n=4$ ).

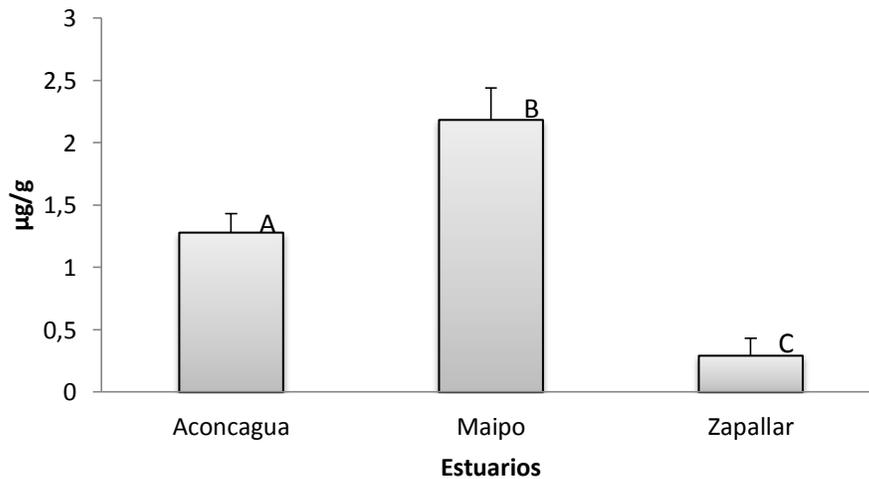
### 6.2.3. Plomo

Las concentraciones de plomo encontradas en los sedimentos de los distintos estuarios, fueron de  $20 \pm 3 \mu\text{g/g}$  para el río Aconcagua,  $0,56 \mu\text{g/g}$  en Laguna de Zapallar y  $0,08 \mu\text{g/g}$  en el río Maipo, tal como se puede observar en la figura 11. Para este metal no se encontraron diferencias significativas entre los estuarios del Maipo y Zapallar, pero si entre estos y el Aconcagua.



**Figura 11:** Concentración de plomo en sedimentos. Letras distintas muestran diferencias significativas. ( $p < 0,05$ ) ( $n=3$ )

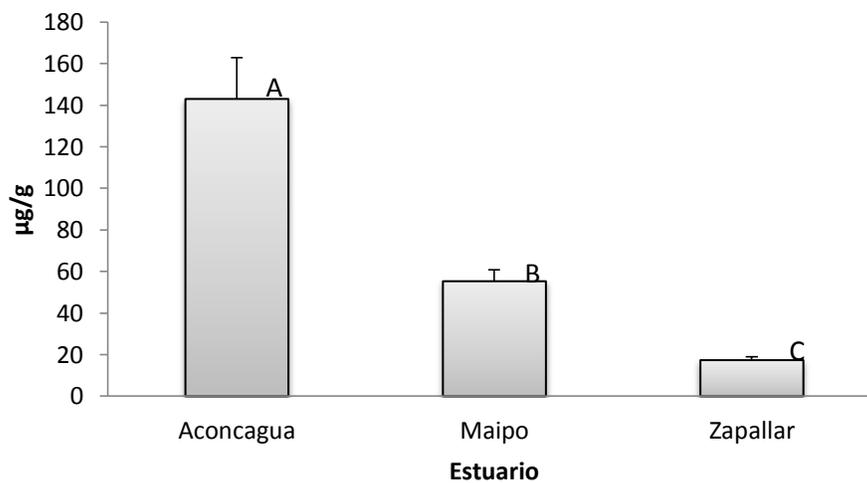
El plomo en tejidos tuvo su mayor concentración en el estuario del río Maipo,  $2,2 \pm 0,2$  µg/g, seguido de los  $1,3 \pm 0,2$  µg/g, encontrados en el Aconcagua y por último la menor concentración de plomo se observó en Zapallar con  $0,3 \pm 0,1$  µg/g (figura 12). Para este metal las diferencias significativas en los tejidos se encontraron en los estuarios de la Laguna de Zapallar, río Maipo y río Aconcagua.



**Figura 12:** Concentración de plomo en tejidos de *P. gualpensis*. Letras diferentes muestran resultados estadísticamente distintos. ( $p < 0,05$ ) ( $n=4$ )

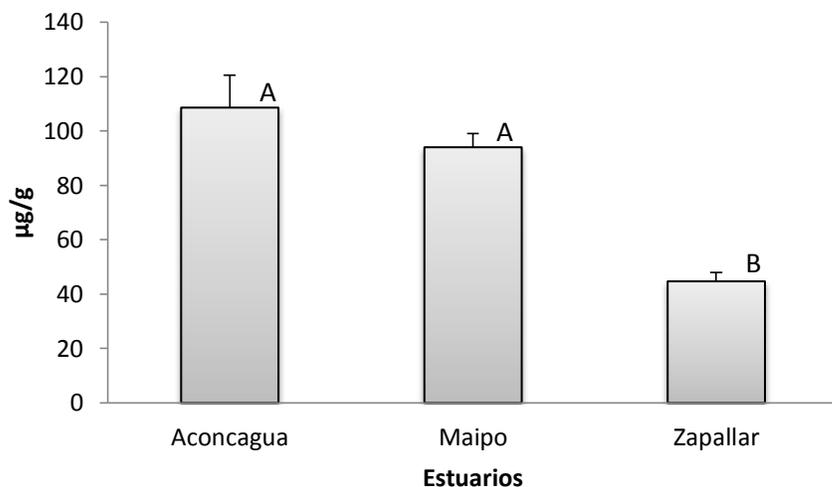
## 6.2.4. Zinc

Las concentraciones en el caso del zinc siguieron el siguiente orden: Aconcagua, Maipo y Zapallar, desde la concentración mayor a la menor, como se observa en la figura 13. Los valores de las concentraciones fueron  $143 \pm 20 \mu\text{g/g}$ ,  $55 \pm 5 \mu\text{g/g}$  y  $17 \pm 2 \mu\text{g/g}$  respectivamente, para este metal las concentraciones de los tres estuarios fueron estadísticamente diferentes.



**Figura 13:** Concentración de zinc en sedimentos. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los estuarios. ( $p < 0,05$  y  $n=3$ )

En el caso del zinc (figura 14), las concentraciones en tejidos del *P.gualpensis* fueron  $109 \pm 12 \mu\text{g/g}$  en el río Aconcagua,  $94 \pm 5$  en el río Maipo y Zapallar  $45 \pm 3 \mu\text{g/g}$ . las diferencias estadísticas en tejidos, para este metal, fueron entre Zapallar y los otros dos estuarios, pero no entre el Maipo y Aconcagua.

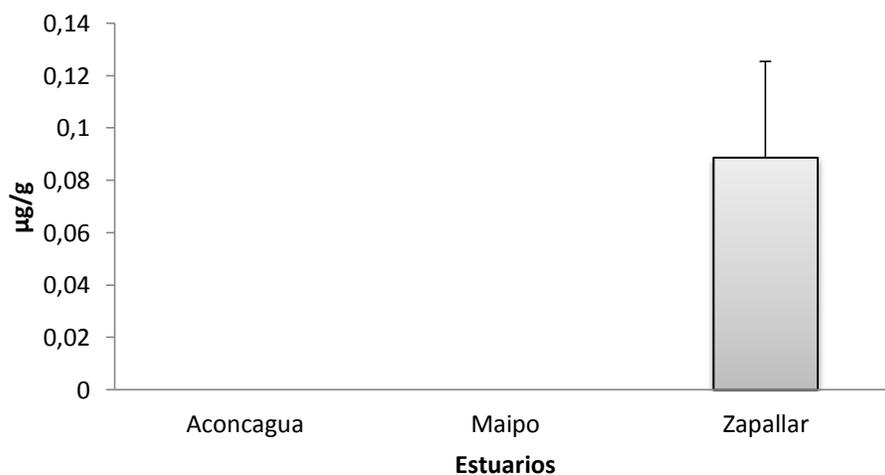


**Figura 14:** Concentración de zinc en tejidos. Letras distintas muestran diferencias significativas entre sitios. ( $p < 0,05$ ) ( $n=4$ )

### 6.2.5. Cadmio

El análisis de la concentración de cadmio en tejidos, mostró a este metal solo en el estuario de Zapallar con una concentración de  $0,09 \pm 0,04$  µg/g, no detectándose en los estuarios del Aconcagua y Maipo, como se muestra en la figura 15.

En el análisis de sedimentos no se detectó presencia de cadmio en ninguno de los estuarios.

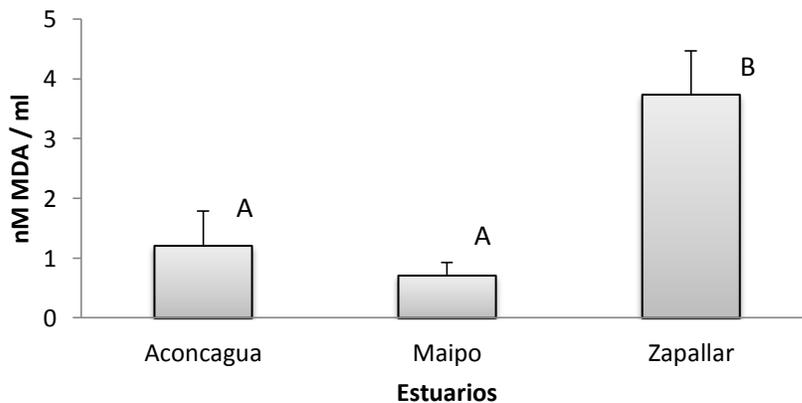


**Figura 15:** Concentración de Cadmio en tejidos del *P.gualpensis*.

## 6.3. Actividad enzimática

### 6.3.1. TBARS

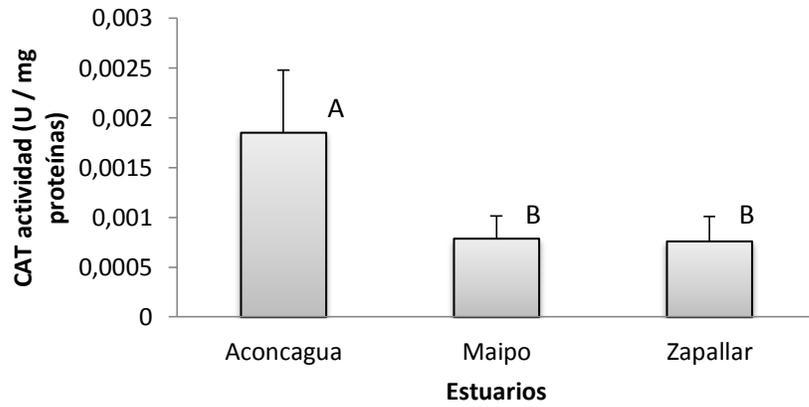
Al analizar los datos promedios de los estuarios (figura 16), los resultados mostraron que la mayor concentración de malondialdehído se encontraba en los organismos (*P.gualpensis*) del estuario conocido como Laguna de Zapallar con un valor de  $3,7 \pm 0,7$  nM MDA/ml, en el estuario del río Aconcagua la concentración de MDA fue de  $1,2 \pm 0,6$  nM MDA/ml y el estuario del Maipo tuvo un valor de  $0,7 \pm 0,2$  nM MDA/ml, aunque se observó que entre los estuarios del Aconcagua y Maipo no hay diferencias significativas, si se encontraron entre estos y el estuario de Zapallar.



**Figura 16:** Concentraciones promedios de malondialdehído encontrados en los distintos estuarios. Letras distintas indican diferencias significativas con ( $p < 0,05$  y  $n=5$ ).

### 6.3.2. Catalasa

Para los distintos estuarios los análisis mostraron que la actividad de la catalasa fue mayor en los organismos del estuario del río Aconcagua ( $0,0018 \pm 6E-04$  U enzima/mg proteínas), ya que en los estuarios de Zapallar ( $0,0008 \pm 2E-04$  U enzima/mg proteínas) y el Maipo ( $0,0008 \pm 2E-04$  U enzima/mg proteínas) no se encontraron diferencias significativas entre el estuario de río Aconcagua con los otros dos estuario, como se muestra en la figura 17



**Figura 17:** Promedios de actividad de la enzima Catalasa en *P. gulapensis* en los distintos estuarios. Letras distintas indican diferencias significativas. ( $P < 0,05$ ) ( $n=5$ )

## 6.4. Relación concentración de metales y actividad enzimática

Para establecer si hay o no relación entre las concentraciones de metales con la actividad enzimática presente en los organismos, con los datos obtenidos se hizo una regresión lineal simple, como se muestra en la tabla 5 y 6.

**Tabla 5:** Regresión simple entre concentración de metales y Tbars

Metales	Ecuación	R <sup>2</sup>	R	P
<b>Cu</b>	Y=0,084X-0,33	0,89	0,95	<0,05
<b>Fe</b>	Y=0,00005X+0,10	0,94	0,97	<0,05
<b>Pb</b>	Y=0,1426X+0,97	0,93	0,97	<0,05
<b>Zn</b>	Y=0,0261X+0,077	0,95	0,98	<0,05
<b>Cd*</b>	----	----	----	---

\*Se detectó solo en Zapallar, lo que no es suficiente para realizar la regresión lineal.

**Tabla 6:** Regresión simple entre concentración de metales y catalasa

Metales	Ecuación	R <sup>2</sup>	R	P
<b>Cu</b>	Y=4E-5X+0,0002	0,75	0,87	<0,05
<b>Fe</b>	Y=1E-8X+0,0004	0,79	0,88	<0,05
<b>Pb</b>	Y=7E-5X+0,0008	0,76	0,87	<0,05
<b>Zn</b>	Y=1E-5X+0,0004	0,80	0,9	<0,05
<b>Cd*</b>	----	----	---	---

\* Se detectó solo en Zapallar, lo que no es suficiente para realizar la regresión lineal.

Además la correlación de los valores de actividad antioxidante y daño oxidativo, muestran un valor significativo de 0,94.

## **7. Discusión**

### **7.1. Metales y características físico químicas en sedimentos**

En relación a parámetros físicos y químicos de los sedimentos, que son los que pueden afectar la biodisponibilidad de los metales, se observa que el pH es ligeramente básico en los estuarios del Maipo y Zapallar y prácticamente neutro en el Aconcagua, lo que según Flores et al., (2011) provocaría que los metales estén menos biodisponibles por qué, lo mismo ocurre con la materia orgánica que atrapa a los metales disminuyendo su biodisponibilidad (Peluso, 2011), ya que ésta presenta una mayor concentración en el estuario del Maipo y menor en el Aconcagua. Otro factor que modifica la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos es el tamaño de las partículas que lo componen, de los tres estuarios estudiados en el que el tamaño fue menor fue el del río Maipo, a diferencia del estuario de Zapallar que tenía partículas de mayor tamaño (Peluso, 2011).

El estuario que presentó una mayor concentración de metales, en los sedimentos, fue el Aconcagua. Esto se podría deber a la alta actividad industrial en las cercanías a su estuario. El estuario del río Maipo, al corresponder a una cuenca que también presenta actividad minera e industrial pero en menor escala que la del Aconcagua, muestra una menor concentración de metales que éste pero siempre mayor que la de Zapallar, con excepción del plomo con el que no tiene diferencias significativas.

Las concentraciones de metales en tejidos de los poliquetos mostraron que entre la mayoría de los estuarios hubo diferencias significativas, no obstante, el cadmio solo se encontró en tejidos de los poliquetos del estuario de Zapallar por lo que no se pudo analizar estadísticamente. También en los tejidos se observó que no en todos los casos las concentraciones siguen el mismo orden que en los sedimentos, ya que el fierro y plomo a pesar de presentar su mayor concentración en el Aconcagua para los sedimentos, en los

tejidos tienen su mayor concentración en el Maipo y el zinc que en los poliquetos no muestra diferencias significativas entre el Aconcagua y Maipo a diferencia de en los sedimentos. Esto según las características analizadas como son el pH, la granulometría y la concentración de materia orgánica, no debería ocurrir ya que el estuario del Maipo es el que por sus características físico-químicas debería tener una menor biodisponibilidad de los metales, por lo tanto se puede decir que otras características, tendrían un mayor impacto en la biodisponibilidad, como por ejemplo el potencial redox que a medida que aumenta su potencial oxidante disminuye la solubilidad de los metales, bajando la biodisponibilidad (Espinosa *et al*, 2011), situación que ocurre en los estuarios estudiados, donde el valor de óxido-reducción del estuario del Maipo es mucho menor que la de los otros estuarios. Las distintas concentraciones de metales trazas como reportó Rainbow (2006) que producen alteraciones que pueden ser medidas para cuantificar los impactos producidos en el ambiente.

Las concentraciones de metales presentes en los sedimentos se pueden comparar con las concentraciones de las playas Paraíso y El lenguado en la Bahía de San Jorge de Antofagasta (Calderón & Valdés, 2012). Al comparar el cobre de los estuarios con los de las playas, se puede observar que las concentraciones son menores en los estuarios de la zona central, lo que se debe a la gran actividad minera en la ciudad de Antofagasta y a los puertos de exportación de concentrado de cobre en la bahía. En cuanto al plomo, se puede exponer que ocurre lo mismo que con el cobre, encontrándose concentraciones menores en los estuarios que en las playas. Otro metal analizado en la bahía San Jorge es el zinc, en este se muestra que el Río Aconcagua tiene una mayor concentración que las dos playas, de Antofagasta, el Maipo muestra una concentración de zinc menor que Playa Paraíso, pero mayor que El Lengüado, y por último, la Laguna de Zapallar tiene una concentración menor que las dos playas. Respecto al caso del cadmio, este no fue detectado en los estuarios pero si en las playas. Por lo tanto, los resultados de los metales coinciden con la actividad industrial presentes en ambas zonas, ya que la zona de Playa

Paraíso se caracteriza por tener altas concentraciones de metales, debido a la alta actividad minera en la zona, al igual que lo que se espera del estuario del Aconcagua.

Otra comparación a realizar, son las concentraciones de metales en sedimentos con los datos encontrados por Velásquez, (2005) en el estuario del Río Valdivia. Con este trabajo se pueden comparar tres metales, comenzando por el cobre que mostró una concentración mayor al estuario de Valdivia en el estuario del Aconcagua, pero concentraciones menores en los estuarios del Maipo y Zapallar. El segundo metal que se compara corresponde al plomo, este muestra un comportamiento similar al cobre, siendo mayor la concentración del Aconcagua y menores las de Maipo y Zapallar, en comparación con el estuario del Valdivia. El fierro presenta una concentración mayor a la del estuario del Valdivia en los estuarios del Aconcagua y Maipo, pero menor en Zapallar. Con esta comparación se puede demostrar que el estuario del Aconcagua tiene una concentración de Cu, Pb y Fe mayor, debido a la alta actividad minera e industrial presente en la zona, ya que en la zona de Valdivia, a diferencia del norte de Chile, no hay actividad minera.

Los metales presentes en los organismos estudiados en el estuario del río Valdivia según Velásquez (2005), también se pueden comparar por los metales medidos en este trabajo de titulación. El cobre en los tres estuarios estudiados presentó concentraciones mayores que las detectadas en el estuario del río Valdivia. En el plomo se detectaron concentraciones mayores en los estuarios de los ríos Aconcagua y Maipo, pero en el estuario de Zapallar se detectó una concentración menor. En cuanto al fierro se encontraron mayores concentraciones en los tres estuarios analizados en comparación con el de Valdivia. Al igual que en los sedimentos, estos resultados coinciden con lo esperado, ya que en la zona de Valdivia la actividad industrial es menor que las del Aconcagua, Zapallar y el Maipo.

El estuario Douro de Portugal, es el final de uno de los ríos más largos de la Península Ibérica, además está cercano a una zona altamente poblada y recibe directamente

efluentes industriales y otras descargas contaminantes en su cuerpo de agua. Mucha *et al.*, (2003) midió las concentraciones de metales presentes de Zn, Cu y Pb, siendo mayor la concentración de zinc del Douro a la de los estuarios del Maipo y de la Laguna de Zapallar pero menor que la del Aconcagua. El cobre de los estuarios del Maipo y Aconcagua tuvo una mayor concentración que las del estuario Douro, siendo menor en Zapallar. El Pb en los tres estuarios estudiados en Chile tuvo una concentración menor al estuario de Portugal.

El trabajo de Souza *et al.*, (2013) que estudió dos estuarios en Brasil, el Santa Cruz y Vitoria Bay, ambos contaminados por actividad portuaria, pero con baja infraestructura urbana cercana, la concentración de cobre en todos los estuarios de Chile estudiados en este trabajo tiene una concentración mayor a la de los dos estuarios de Brasil. El fierro de los estuarios del Maipo y Aconcagua es mayor a los estuarios Santa Cruz y Vitoria Bay, pero es menor en el estuario de Zapallar en comparación con estos. El Zn tiene concentraciones bajo el límite de detección en Santa Cruz y Vitoria Bay por lo que son menores que las de los estuarios chilenos. El Cd al igual que en los estuarios del Maipo y Aconcagua y Zapallar no fue detectado. El plomo fue mayor en el estuario del Aconcagua en comparación con Santa Cruz y Vitoria Bay, pero menor en los estuarios del Maipo y Laguna de Zapallar. Estos valores indican que las concentraciones de metales están relacionadas con la actividad industrial, que es mayor en los estuarios chilenos al igual que las concentraciones.

En Australia, O'Brien & Keough (2013) analizó cuatro estuarios con distintos niveles de contaminación, el Kororoit Creek, Little River, Merricks Creek y Werribee River, indicando que uno de estos presenta una concentración de cobre mayor a los estuarios del Maipo, Aconcagua y Zapallar, y los otros tres estuarios tienen concentraciones de cobre mayor al Maipo y Zapallar pero menor al Aconcagua. El fierro tiene concentraciones mayores en los estuarios de Maipo y Aconcagua a los cuatro estuarios Australianos, pero menores a estos en Zapallar. El plomo en tres estuarios Australianos mostro concentraciones mayores a los

tres estuarios analizados en este trabajo y en uno concentraciones menores al Aconcagua pero mayor a Zapallar y Maipo. El Zn presento todos los estuarios australianos concentraciones mayores a las del estuario la Laguna de Zapallar, en tres estuarios concentraciones mayores que las del Maipo y Zapallar y en un estuario concentraciones mayores que en los tres estuarios analizados. El cadmio se detectó en tres de cuatro estuarios, siendo mayor que las concentraciones encontradas en Chile ya que no se detectaron.

Éstas tres comparaciones con estuarios de países distintos a Chile nos muestran que el estuario del Aconcagua tiene altas concentraciones de metales, no así los estuarios del Maipo y de la Laguna de Zapallar que presentan concentraciones similares a las de otros países que presentan una industrialización mayor que Chile.

El patrón de abundancia de la concentración de metales en algunos organismos de los Campos de Hielo Sur, según Ahumada *et al.* (2015), Siguieron el siguiente orden Zn>Ba>Cu>Co>Cd>Cr>Ni>Pb, de éstos metales en éste estudio se analizaron cuatro, los que siguen el siguiente orden: Fe>Cu>Zn>Pb>Cd, distinto a lo observado por Ahumada ya que el cobre y plomo presentan mayores abundancias, esto se puede asociar a la explotación minera del cobre existente en la zona central del país en comparación con el sur de Chile.

## **7.2. Actividad enzimática en Poliquetos**

La actividad de la catalasa y las concentraciones de malondialdehído, se relacionaron con las concentraciones de metales en tejido. Lo que sugiere que éstos agente están biodisponibles en los sedimentos. Al respecto se conoce que los metales provocan estrés oxidativo ya que interactúan con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberando moléculas HO, que provocan daño en la membrana, en proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Olivares *et al.*, 2002).

Los poliquetos del estuario de Zapallar, presentaron el mayor daño oxidativo, contrario a lo esperado, ya que es la zona con menor actividad industrial, Jara *et al.*, (2009), reporta que la zona con mayor actividad industrial presenta el mayor daño oxidativo. Estos resultados se deberían a que en el estuario de La Laguna de Zapallar estarían presentes otros agentes químicos que no fueron determinados en este estudio y que podrían generar estrés oxidativo. Otra de las variables que podría influir es la salinidad, como muestra Freitas *et al.*, (2015) en su estudio en el poliqueto *Diopatra neapolitana*, en el que indica que la salinidad no tiene un impacto significativo en la presencia de catalasa, pero si provoca estrés oxidativo en los poliquetos que en este estuario tiene un alto valor en comparación con los otros. Además, Zapallar fue el único estuario en el que se detectó cadmio en los tejidos, metal que produce daño oxidativo, como lo observa Sun & Zhou (2008) en su trabajo en el poliqueto *Nereis diversicolor*, por lo que la presencia de este podría explicar los resultados observados.

Al comparar las concentraciones de MDA con las reportados por Díaz-Jaramillo *et al.* (2013), en los estuarios de Lengua y Raqui, estas son mayores que las medidas en este estudio en los estuarios del Aconcagua y Maipo, en cambio, Zapallar tienen una concentración mayor de malondialdehído, esto indica que los organismos de este estuario tienen un daño oxidativo mayor que los observados por Díaz-Jaramillo *et al.* (2013), éste estrés oxidativo ocurriría debido a los impactos provocados en los estuarios de la zona central por los residuos producidos por las distintas actividades industriales que en la zona central son mayores (destacando la minería) a las presentes en la zona sur, que es a la que corresponden Lengua y Raqui.

La actividad enzimática de la catalasa es mayor en el estuario del Aconcagua, seguida por los estuarios del Maipo y Zapallar que no presentan diferencias significativas. Lo que indica que los organismos que presentan una mayor defensa contra el daño oxidativo son los del Aconcagua. Al respecto, Cavaletto *et al* (2008) indica que la catalasa presenta un

aumento en su actividad cuando los organismos son expuestos a agentes oxidantes, generándose estrés y daño.

Al relacionar la concentración de metales con la presencia de daño oxidativo y actividad antioxidante en la especie *P. gualpensis* se pudo observar que en general la relación es significativa, lo que nos indicaría que al aumentar el daño oxidativo también deberá incrementar la actividad antioxidante. Un resultado similar a este fue encontrado por Murube (2014) que reportó cambios en la actividad antioxidante en respuesta al estrés oxidativo. Una situación similar se observó por Geracitano *et al* (2014) quien al analizar la respuesta de poliquetos expuestos a distintas concentraciones de cobre pudo observar un aumento en la actividad de la enzima catalasa.

## 8. Conclusiones

Los sedimentos y tejidos presentan concentraciones de metales que difieren significativamente entre los estuarios. Las concentraciones en sedimentos siguieron el siguiente orden decreciente: Fe>Zn>Cu>Pb, no detectándose cadmio. En tejidos del *Perieneris gualpensis* el orden fue: Fe>Cu>Zn>Pb>Cd.

La respuesta de las variables de estrés oxidativo, es decir actividad de catalasa y concentración de malondialdehído, fueron diferentes entre los estuarios. Los organismos que presentaron un mayor daño oxidativo fueron los del estuarios de Zapallar y los que tuvieron más actividad de catalasa fueron los del estuario del Aconcagua. En general, las respuestas se relacionaron con las concentraciones de metales en los sedimentos.

Los metales estudiados se encuentran en concentraciones biodisponibles y pueden representar un riesgo ambiental para los organismos que habitan los sedimentos estuarinos.

## 9. Referencias bibliográficas

1. Acosta V., C. Lodeiros, W. Senior & G. Marínez. 2002. Niveles de metales pesados en sedimentos superficiales en tres zonas litorales de Venezuela. *Interciencia* 27: 686-690.
2. Alcalá J., M. Sosa, M. Moreno, J. Rodríguez, C. Quintana, C. Terrazas & O. Rivero. 2009. Metales pesados en suelo urbano como un indicador de la calidad ambiental: ciudad de chihuahua, México. *Multequina* 18: 53-69
3. Ahumada R., E. González, J. Neira. 2004. Especiación del zinc en sedimentos marinos del fiordo Aysén. *Investigaciones Marinas* 38: 3-10.
4. Ahumada R., Ahumada-Rudolph R., González E. 2015. Contenidos de metales (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn) en organismos bentónicos de áreas prístinas: Campos de hielo sur (48°-52° lat. Sur), Chile. *Gayana* 79: 128-136.
5. Alam N. & N. Jahan. 2012. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal* 21: 143–152.
6. Angeletti S., L. Lescano & P. Cervellini. 2014. Biosedimentological and mineralogical characterization of two intertidal areas of bahia blanca estuary. *Geoacta* 39: 54-67
7. Boada M., M. Moreno, H. Gil, J. Marcano & J. Maza. 2007. Metales pesados (cu+2, cd+2, pb+2, zn+2) en músculo y cefalotórax de camarones silvestres *litopenaeus schmitti*, *farfantepenaeus subtilis*, *f. notialis* y *f. brasiliensis* de la región oriental de venezuela. *Rev. Cientif. FCV-LUZ* 17: 186-192.
8. Bozo L., M. Fernández, M. López, R. Reyes & P. Suarez. 2007. Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *INCI (online)* Vol. 32: 8-13.
9. Calderón C. & J. Valdés. 2012. Contenido de metales en sedimentos y organismos bentónicos de la bahía San Jorge, Antofagasta, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 47: 121-133.
10. Cañete J., G Leighton & E. Soto. 2000. Proposición de un índice de vigilancia ambiental basado en la variabilidad temporal de la abundancia de dos especies de

- poliquetos bentónicos de bahía Quintero, Chile. Revista de biología marina y oceanográfica 35: 185-194.
11. Castro G. & J. Valdés. 2012. Concentración de metales pesados (Cu, Ni, Zn, Cd, Pb) en la biota y sedimentos de una plata artificial, en la bahía San Jorge 23°S, norte de Chile. Latin American Journal of Aquatic Research 40: 267-281.
  12. Cavaletto M., A. Ghezzi, B. Burlando, V. Evangelisti, N. Ceratto & A. Viarengo. 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and mtallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 131: 447-455.
  13. Céspedes M., I. Hernández & N. Llópiz. 1996. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. Rev. Cubana Invest. Bioméd. 15: 75-81.
  14. Cubillos A., P. Gädicke, D. Von Baer & F. Ahumada. 1999. Determinación de dosis letal media (DL50) de alcaloides del lupino en pollas de reposición blancas y marón. Arch. Med. Vet. 31: 249-256.
  15. Díaz-Jaramillo M., J. Ferreira, L. Amado, J. Ventura-Lima & A. Martins. 2010. Biomonitoring of antioxidant and oxidative stress responses in *Perinereis gualpensis* (Polychaeta: Nereididae) in Chilean estuarine regions under different anthropogenic pressure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73: 515–523.
  16. Díaz-Jaramillo M., A. Martins, G. Chiang, D. Buchwalter, J. Monserrat & R. Barra. 2013. Biochemical and behavioral responses in the estuarine polychaete *Perinereis gualpensis* (Nereididae) after in situ exposure to polluted sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf. 89: 182-188.
  17. Dirección General de Aguas Santiago Chile, 2003. Evaluación de los recursos hídricos superficiales en la cuenca del río Maipo. 117 p.
  18. Eróstegui C. 2009. Contaminación por metales pesados. Revista Científica Ciencia Médica 12: 45-46.
  19. Espinosa L., J. Parra & C. Villamil. 2011. Determinación del contenido de metales pesados en las fracciones geoquímicas del sedimento superficial asociado a los

- manglares de la ciénaga grande de santa marta, Colombia. Bol. Invest. Mar. Cost. 40: 7-23.
20. Freitas R., A. Pires, C. Velez, A. Almeida, F. Wrona, A. Soares & Figueira. 2015. The effects of salinity changes on the Polychaete *Diopatra neapolitana*: Impacts on regenerative capacity and biochemical markers. Aquatic Toxicology 163: 167-176-
  21. Gaete H., F. Aranguiz, G. Cienfuegos. 2007. Metales pesados y toxicidad de aguas del río Aconcagua en Chile. Quim. Nova 30: 885-891.
  22. Gaete H., M. Hidalgo, A. Neaman & G. Ávila, 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. Quim. Nova 33: 566-570.
  23. Gamez C. & E. Ramírez. 2008. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Tesis de pregrado, Universidad de la Salle. Colombia. 208 p.
  24. Geracitano L., R. Bocchetti, J. Monserrat, F. Regoli, A. Bianchini. 2004. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis actua* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. Marine Environmental Research 58: 1-17.
  25. Gobierno regional de Valparaíso. 2014. Propuesta estrategia regional de innovación, Valparaíso Chile. 80 p.
  26. Govind P. & S. Madhuri. 2014. Heavy Metals Causing toxicity in animals and fishes. Research Journal of Animal 2: 17-23.
  27. Granado C. 1996. Ecología de peces. Universidad de Sevilla. 353 p.
  28. Jara C., H. Gaete, G. Lobos & M. Hidalgo. 2014. Oxidative stress in the mollusk *Echinolittorina peruviana* (Gasteropoda: Littorinidae, Lamarck, 1822) and trace metals in coastal sectors with mining activity. Ecotoxicology 23: 1099-1108.
  29. Kuk Dzul J., V. Delgado & J. Tejero. 2006. Poliquetos de sustrato arenoso como bioindicadores de contaminación por materia orgánica en la zona urbana de la bahía

- de Chetumal, Quintana Roo. V Congreso Internacional y XI Nacional de Ciencias Ambientales, Oaxtepec, Morelos, México. 8 p.
30. Leyton M., M. Mellado, C. Jara, I. Montenegro, S. González & A. Madrid A. 2015. Free radical-scavenging activity of sequential leaf extracts of *Embothrium coccineum*. *Open life sciences* 10: 260-268.
  31. Luque C., E. Castellanos, J. Castillo, M. González, M. González, M. Figueroa. 1998. Distribución de metales pesados en sedimentos de las marismas del Odiel (Huelva, So. España). *Cuaternario y Geomorfología* 12: 77-85.
  32. Mancera-Rodríguez N. & R. Álvarez-León. 2006 Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 11: 3-23.
  33. Martínez C. & Cortez. 2007. Características hidrográficas y sedimentológicas en el estuario del río Aconcagua, Chile Central. *Revista Geográfica Norte Grande* 37: 63-74.
  34. Méndez N. & C. Green-Ruiz. 2005. Preliminary observations of cadmium and copper effects on juveniles of the polychaete *Capitella* sp. y (Annelida: Polychaeta) from Estero del Yugo, Mazatlán, México. *Revista chilena de historia natural* 78: 701-710.
  35. Ministerio del Medio Ambiente. 2013. Primer reporte del estado del medio ambiente, Santiago, Chile. 152 p.
  36. Monserrat J., P. Martínez, L. Geracitano, L. Amado, C. Gaspar, G. Leaes & I. Soares. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Compar. Biochemical And Physiology* 46: 221-234
  37. Mucha A., M. Vasconcelos & A. Bordalo. 2003. Macrobenthic community in the Douro estuary: relations with trace metals and natural sediment characteristics. Portugal. *Environmental Pollution* 121: 169-180.
  38. Muñoz P. & M. Salamanca. 2001. Flujo de plomo particulado a los sedimentos marinos y su incorporación en *Paraprionospio pinnata* (Polychaeta: spionidae) en bahía Concepción (36° lat. S), Chile. *Gayana* 65:155-166.
  39. Murube E. 2014. Estrés oxidativo y respuestas fisiológicas a la acumulación de metales pesados en *Betula celtibérica* micorrizada y no micorrizada cultivada en un

- suelo contaminado. Tesis para Master en biotecnología aplicada a la conservación y gestión sostenible de recursos vegetales. Universidad de Oviedo. 27 p.
40. O'Brien A. & M. Keough. 2013. Detecting benthic community responses to pollution in estuaries: a field mesocosm approach. *Environmental pollution* 175: 45-55.
  41. Olivares E., E. Peña & G. Aguilar. 2002. Nutrición mineral y estrés oxidativo por metales en espinaca y lechuga, en comparación con dos malezas asociadas, en cultivos semi-urbanos. *INCI (online)* 27: 454-464.
  42. Peluso M. 2011. Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del río de la Plata y afluentes. Tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata. Argentina. 178p
  43. Piccolo M. & G. Perillo. 1997. Geomorfología e Hidrografía de los estuarios. *El mar Argentino y sus recursos pesqueros* 1: 133-161.
  44. Pritchard. D. 1967. What is an Estuary: Physical View point. The Johns Hopkins University, Baltimore.
  45. Rainbow PS. 2006. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 12:107-122.
  46. Ramírez P. & A. Mendoza. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, La experiencia en México. Primera edición. Secretaría de Medio ambiente y recursos naturales, 276 p.
  47. Rendón J. 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos, Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. *Instituto nacional de ecología* 696 p. 121-140.
  48. Repetto M. & G. Repetto. 2009. *Toxicología Fundamental*, 4ta edición. Ediciones Díaz de Santos. 565 p.
  49. Rojas Mallorquín & Citlalli M. 2011. Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de hidroeléctrica (P.H Las cruces) en Nayloril, México. Tesis para obtener el título de licenciado en biología. Jalisco, México. Universidad de Guadalajara, 166 p.

50. Rozbaczylo N., R. Moreno & O. Diaz-Diaz. 2006. Poliquetos bentónicos submareales de fondos blandos de la región de Aysén, Chile: Clados Amphinomida, Eunicida, Spionida, Sabellida y Scolecida (Annelida, Polychaeta). Invest. Mar. Valparaíso 34: 43-62.
51. Rozbaczylo N., R. Moreno, C. Canales & C. Hernández. 2006. Diversidad específica y caracterización genética de poliquetos bentónicos de fondos blandos recolectados durante el crucero Cimar 12 fiordos entre el estuario Reloncaví y el golfo Corcovado. Universidad de Concepción, 93-112
52. Sampertegui S., N. Rozbaczylo, C. Canales, F. Carrasco, C. Hernandez & E. Rodriguez. 2013. Morphological and molecular Characterization of *Perinereis gualpensis* (Polychaeta: Nereididae) and its phylogenetic relationships with other species of the genus off the Chilean coast, Southeast Pacific. Cahiers de Biologie Marine 54: 27-40.
53. Scelzo M. 1997. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Invest. Mar. Valparaíso 25: 177-185.
54. Souza I., I. Duarte, N. Pimentel & L. Rocha. 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. Brasil. Environmental Pollution 130: 136-144.
55. Soto P., H. Gaete & M. Hidalgo. 2011. Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-*a*, and growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. Latin American Journal of Aquatic Research 29: 280-285.
56. Stuardo V. & C. Valdovinos. 1989. Estuarios y lagunas costeras: ecosistemas importantes del Chile central. Amb. Y des. 1:107-115.
57. Sun F. & Q. Zhou. 2008. Oxidative stress biomarkers of the polychaete *Nereis diversicolor* exposed to cadmium and petroleum hydrocarbons. Ecotoxicology and Environmental Safety 70: 106-114.

58. Tovar-Hernández M., P. Salazar & S. Vallejo. 2014 Biodiversidad de Polychaeta (annelida) en México biodiversity of Polychaeta (Annelida) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 190-196.
59. UNEP. 1995. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Reference Methods for Marine Pollution Studies* 63. 85 p.
60. Valko M., D. Leibfritz, J. Monco, M. Cronin, M. Mazur & J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39: 44-84.
61. Velásquez D. 2005. Determinación de metales pesados en biota (*Mytilus chilensis*) y sedimentos de la bahía de corral, Provincia de Valdivia, X Region. Tesis para obtener el título de químico farmacéutico. Universidad Austral de Chile. 93 p.
62. Venkatramanan S., S. Chung, T. Ramkumar, G. Gnanachandrasamy & T. Kim. 2015. Evaluation of geochemical behavior and heavy metal distribution of sediments: The case study of the Tirumalairajan river estuary, southeast coast of India. *International Journal of Sediment Research* 30: 28-38.
63. Vullo D., 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva* 2: 93-104.
64. Yáñez A., A. Lara, P. Sánchez & J. Day. 2003. Interacciones ecológicas estuario-mar: marco conceptual para el manejo ambiental costero. *Los ecosistemas del golfo de México* 1: 438-439.