

2023

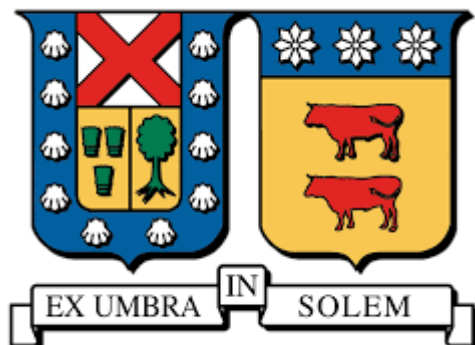
Nivel de toxicidad del desinfectante potenza en el ciclo vital de daphnia magna

CARTES MILLÁN, VALENTINA CONSTANZA

<https://hdl.handle.net/11673/55493>

Repositorio Digital USM, UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA Y MEDIO AMBIENTE



**“Nivel de toxicidad del desinfectante Potenza en el
ciclo vital de Daphnia Magna”**

Memoria para optar al título de Ingeniería de ejecución
en Gestión y Control Ambiental

Profesor guía

Sr. Juan Pablo Inostroza Diaz.

Srta. Valentina Cartes Millán.

Marzo 2023

INDICE

CAPITULO I	3
1.1 RESUMEN	3
1.2 ABSTRACT	4
1.3 INTRODUCCION	5
1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECIFICOS.	7
HIPOTESIS.	8
CAPITULO II: MARCO REFERENCIAL	8
2.1 MARCO TEORICO.	8
2.2 MARCO EMPIRICO.	23
CAPITULO III: METODOLOGIA.	28
3.1 MATERIAL Y METODO.	28
3.2 DESARROLLO	33
CAPITULO IV: PRESENTACION DE LOS RESULTADOS	36
4.1 RESULTADOS	36
CAPITULO V: DISCUSIÓN	39
CAPITULO VI: CONCLUSION	41
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:	42

CAPITULO I

1.1 RESUMEN

Se dará a conocer cuál es la composición química del desinfectante líquido a base de amonio cuaternario de cuarta generación el que de forma general se encuentra constituido por una mezcla de 4 amonios y etanol al 95% el que se definirá más profundamente.

Se realiza posteriormente la aplicación de este amonio cuaternario al ciclo vital de la Daphnia Magna, lo que permitió determinar el nivel de toxicidad del desinfectante en el ciclo vital del Bioindicador ambiental daphnia magna, respecto de su toxicidad y alteración a los estados y reproducción de esta, análisis elaborados en el centro EULA Universidad de Concepción.

Se utilizaron distintos instrumentos de medición para su análisis. Para la realización del bioensayo agudo se utilizaron 5 concentraciones con 4 réplicas para cada una y con control con al igual 4 réplicas, en el que cada replica contiene 5 neonatos de daphnia magna en donde se obtienen resultados a las 24 y 48 horas.

En esta investigación se busca poder aportar a través de la evidencia el grado de toxicidad a la salud del medio ambiente, como también de las personas y la alteración que podría significar en la calidad de vida.

Palabras claves: Nivel de toxicidad, amonios cuaternarios, Daphnia Magna

1.2 ABSTRACT

The chemical composition of the fourth generation quaternary ammonium-based liquid disinfectant will be announced, which in general consists of a mixture of 4 ammonium and 95% ethanol, which will be defined more deeply.

The application of this quaternary ammonium to the life cycle of *Daphnia Magna* is subsequently carried out, which allowed to determine the level of toxicity of the disinfectant in the life cycle of the environmental bioindicator *daphnia magna*, regarding its toxicity and alteration to the states and reproduction of this, analyzes elaborated in the EULA center University of Concepción.

Different measuring instruments were used for analysis. For the realization of the acute bioassay, 5 concentrations were used with 4 replicas for each one and with control with the same 4 replicates, in which each replica contains 5 neonates of *daphnia magna* where results are obtained at 24 and 48 hours.

This research seeks to be able to contribute through evidence the degree of toxicity to the health of the environment, as well as of people and the alteration that

could mean in the quality of life.

1.3 INTRODUCCION

Durante la pandemia el uso de químicos desinfectantes en recintos de salud y hogares tuvo una gran alza debido al covid-19 y su desinformación sobre este virus. Las personas por desconocimiento hicieron mal uso de ciertos productos, usándolos en cualquier lugar sin conocer el alcance de los riesgos a su salud, además los daños que producen estos químicos en el medio ambiente. Por ejemplo, el mal uso del amonio cuaternario fue muy criticado cuando se comprobó el daño que podía provocar en la salud, pero lo que hasta hoy la mayoría de la población de nuestro país desconoce es el daño que puede implicar en el ecosistema.

Se dará a conocer cuál es la composición química del desinfectante líquido a base de amonio cuaternario de cuarta generación se encuentra constituido por una mezcla de 4 amonios y etanol al 95% que se definirá más adelante.

Posteriormente se aplicará al ciclo vital de la *Daphnia Magna* con los análisis elaborados en el Centro Europa Latinoamericana (EULA) Universidad de Concepción.

Se utilizaron distintos instrumentos de medición para su análisis. Para la realización del bioensayo agudo se utilizaron 5 concentraciones con 4 réplicas para cada una y con control con al igual 4 réplicas, en el que cada replica contiene 5 neonatos de *daphnia magna* en donde se obtienen resultados a las 24 y 48 horas.

Poder aportar a través de la evidencia el grado de toxicidad a la salud del medio ambiente, las personas y la alteración que podría significar en su calidad de vida

De acuerdo con lo anterior el objetivo de esta investigación es: Determinar cuál es el nivel de toxicidad del desinfectante en el ciclo vital del Bioindicador ambiental daphnia magna.

1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el nivel de toxicidad del desinfectante en el ciclo vital del Bioindicador ambiental Daphnia Magna

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Identificar la composición del producto desinfectante Químico.
- Analizar los parámetros fisicoquímicos del producto Químico.
- Realizar bioensayos de toxicidad aguda y crónica en distintas concentraciones del químico.

HIPOTESIS.

“A mayor concentración del producto potencia, mayor toxicidad a nivel agudo y crónica en Daphnia Magna.”

CAPITULO II: MARCO REFERENCIAL

2.1 MARCO TEORICO.

Amonio cuaternario (Cuaternarios de amonio o "Quats")

Corresponden a una familia de compuestos cuya estructura básica es el catión amonio (NH_4^+) y que al ser modificados han dado a lugar a distintos agentes desinfectantes. Son solubles en agua y alcohol, actúan en medio ácido, pero principalmente en medio alcalino, tienen propiedades tenso-activas y su actividad se ve disminuida con la presencia de materia orgánica. Presentan una acción desinfectante desde concentraciones de 0,25% o mayores, para uso principalmente en superficies de mobiliario clínico y planta física de centros hospitalarios. Para estos fines son utilizados en soluciones acuosas o mezclados con detergentes para combinar la limpieza y desinfección en una sola aplicación.

Se asocian generalmente a aminas terciarias en las formulaciones desinfectantes aumentando su acción biocida. Las sales de amonio cuaternario se reconocen generalmente como compuestos incoloros o de coloración amarilla, son inodoros, desodorantes y no irritantes a concentraciones habituales. (Diomedi, Alexis, Chacón, Eiiiana, Delpiano y cols., 2017)

Usos y generaciones

La modificación de estos compuestos de amonio cuaternario (QAC) en el tiempo ha logrado constituir distintas generaciones de antisépticos que se detallan a continuación:

- *Primera, segunda y tercera generación*

Cloruro de benzalconio fue el primer compuesto utilizado como antiséptico y mantiene un amplio uso en desinfección hospitalaria hasta la actualidad; esta molécula presentaba un grupo alquilo con más número de carbonos obteniendo una mayor potencia antimicrobiana.

Los compuestos cuaternarios de segunda generación como cloruro de etilbencilo y los de tercera generación que corresponden a mezclas de moléculas de primera y segunda generación, como cloruro de benzalconio y cloruro de alquil-dimetil-etilbencil amonio respectivamente, presentan un aumento importante en la actividad desinfectante y potencialmente una menor resistencia microbiana frente al uso repetido de un solo compuesto.

- *Cuarta y quinta generación*

Los compuestos de cuarta generación como cloruro de didecil-dimetil amonio, también denominados de *cadena gemela* por su estructura con cadenas dialquílicas lineales, se caracterizan principalmente por su alta tolerancia al agua dura y a las cargas de proteínas. Se utilizan también en otras industrias como de alimentos, bebidas, textil, del papel, entre otras.

Finalmente, los compuestos de quinta generación corresponden a mezclas de moléculas de segunda y cuarta generación, como cloruro de alquil-dimetil-etil-bencil amonio, cloruro de didecil-dimetil amonio más otras moléculas según las diferentes formulaciones, obteniendo un mayor rendimiento microbicida especialmente en condiciones ambientales difíciles y un uso más seguro, que es característica de estos compuestos conforme se avanza en sus generaciones.

En el campo clínico, sus usos actuales más frecuentes son la limpieza y desinfección de superficies (pisos, paredes, puertas, vidrios) de centros hospitalarios, materiales y equipos como camas, mesas, veladores, bombas de infusión, monitores, atriles, máquinas de rayos, de diálisis, etc. y artículos no críticos como esfigmomanómetros, oxímetros de pulso, incluyendo también algunos elementos de baños como lavatorios, chatas, patos, entre otros. Son también reconocidamente no corrosivos para los metales.

Los compuestos de amonio cuaternario son compatibles con la mayoría de materiales donde ejercen su acción como vidrio, cerámica, aluminio, acero inoxidable, goma, etc.

No son reconocidos como más efectivos que otros compuestos desinfectantes y en general su costo es superior al de los productos clorados. En Imagen 1, se caracterizan las principales propiedades de los compuestos de amonio cuaternario.

Toxicidad	+
Corrosión	-
Amplio espectro	++
Inactivación	+++

Imagen1. Características de Compuestos de Amonio cuaternario (QAC) (Diomedi, Alexis, Chacón, Eiiiana, Delpiano y cols., 2017)

Mecanismo de acción

Estas moléculas desorganizan la disposición normal de la membrana celular o la envoltura de los distintos agentes infecciosos, uniéndose en forma irreversible a los fosfolípidos y las proteínas de esta estructura.

De esta manera provocan alteración de su permeabilidad, salida del material vital citoplasmático y la liberación de diversos metabolitos a la célula microbiana que interfieren directamente en su cadena respiratoria o metabolismo energético.

Otros mecanismos de acción que se les atribuyen son la inactivación de enzimas y la desnaturalización de algunas proteínas esenciales para el desarrollo de los agentes microbianos. La acción biocida de las aminas terciarias, que acompañan a

los compuestos de amonio cuaternario en los desinfectantes, se debe también a su interacción con la membrana plasmática.

Espectro de acción

El espectro de acción de los compuestos de amonio cuaternario, siendo combinados con aminos terciarios, es muy amplio presentando actividad desinfectante sobre bacterias vegetativas, hongos y virus, principalmente sobre aquellos envueltos (lipídicos) y de tamaño grande o mediano como, por ejemplo: virus herpes simplex, virus de hepatitis B y VIH, entre otros.

Dentro de su acción se ha destacado especialmente su excelente eficacia sobre las bacterias grampositivas.

Por otra parte, los cuaternarios de amonio presentan algunas limitaciones frente a esporas bacterianas, *M. tuberculosis* y virus pequeños, en forma independiente de su generación, y no tienen actividad frente a priones. En la Imagen 2 se resume el espectro de acción de este tipo de desinfectantes. (Diomedi, Alexis, Chacón, Eiiiana, Delpiano y cols., 2017)

Gram positivos	Gram negativos	Micobacterias	Virus lipídicos	Virus no lipídicos	Hongos	Esporas
+++	++	+	+++	+	++	+/-

Imagen 2. Espectro de Acción de Compuestos de Amonio Cuaternario (QAC)

Es relevante también mencionar el desarrollo de mecanismos de resistencia o tolerancia codificadas genéticamente por algunos microorganismos que han

sido descritos frente al uso de este tipo de desinfectantes a su vez se ha reportado contaminación de envases de estos productos por bacilos gramnegativos no fermentadores (*P. aeruginosa*) con un mecanismo de resistencia mediado por bombas de eflujo.

Tiempo y duración de acción

El tiempo de inicio de acción de estos desinfectantes se desconoce, pero es considerado rápido, desde 5 min o antes en compuestos con alcohol⁸⁹. La duración de la acción no ha podido ser claramente establecida; sin embargo, como en la mayoría de los agentes desinfectantes, no se recomienda su uso más allá de 24 h.

Las soluciones de amonio cuaternario deben guardarse en recipientes cerrados, lugares exclusivos y limpios, a temperatura ambiente y protegidos de exposición a la luz.

Efectos adversos

Estos compuestos pueden producir irritación de piel y mucosas (incluyendo ojos) a altas concentraciones. En cambio, las soluciones diluidas no suelen producir irritación cutánea. En personas alérgicas pueden producir dermatitis atópica con irritación nasal o cuadros bronquiales obstructivos, y en personas en contacto

prolongado con el desinfectante pueden ocasionar dermatitis de contacto. Su ingesta accidental puede provocar náuseas, vómitos y dolor abdominal.

Es muy importante que la dilución de estos compuestos sea centralizada y el personal que los manipule utilice siempre guantes. En caso accidental de contacto ocular, de la piel o mucosas, se debe lavar la zona afectada con abundante agua, y en caso de derrame, es necesario utilizar algún material absorbente para retirarlo.

Las soluciones comerciales son en su mayoría biodegradables y por lo tanto podrían eliminarse por alcantarillado en caso de excedente luego de su uso. No existen límites de concentración de este tipo de desinfectantes en aire ambiental para el personal expuesto. El manejo de estas soluciones debe respetar las políticas institucionales de cada centro sobre el uso de antisépticos y desinfectantes en relación a tipos, diluciones -se debe seguir la recomendación del fabricante- indicaciones, rotulaciones, duración, mantenimiento, supervisiones y eliminación que se deben cumplir de acuerdo a la normativa. . (Diomedi, Alexis, Chacón, Eiiiana, Delpiano y cols., 2017)

Daphnia magna: Ensayos subletales

El desarrollo reciente de bioensayos basados en el estudio de respuestas fisiológicas de organismos expuestos a contaminantes ha proporcionado las herramientas bioquímicas necesarias para desarrollar programas de evaluación sobre los efectos de dichos compuestos. En las últimas décadas, un taxón de

invertebrados ha emergido como grupo clave para la realización de ensayos ecotoxicológicos, los Crustáceos cladóceros (dáfidos), entre ellos, *Daphnia magna*, ha sido ampliamente utilizada como representante de invertebrados de agua dulce (Lewis and Maki, 1981; Goulden et al., 1982; Gaete et al., 1999; Olmstead and LeBlanc., 2000).

De acuerdo a Tortorelli et al. (1990) y Barata et al. (2004), son varias las razones que se concluyen para elegir a individuos de este género. Son organismos de amplia distribución y representantes importantes de la comunidad zooplanctónica, sensibles a una variada gama de tóxicos, fáciles de cultivar en laboratorio, se adaptan sin problemas a condiciones de cultivos estáticos, semiestáticos o de flujo continuo en acuarios. Además, poseen un bajo costo asociado a la mantención de los cultivos, presentan generaciones cortas y con alto número de crías, con lo que se puede realizar estudios sobre generaciones sucesivas en test de toxicidad crónicos. Finalmente son partenogénicas, es decir, se reproducen asexualmente originando solo hembras en condiciones ambientales óptimas. De esta forma aseguran uniformidad de respuesta a determinadas condiciones ambientales.

Contrariamente, la desventaja que puede presentar es que su sensibilidad a tóxicos podría ser dependiente de la edad.

Biología y ciclo de vida.

Tabla 1: Ubicación taxonómica del organismo Daphnia.

Phylum:	Artrópoda
Clase:	Crustácea
Subclase:	Branchiopoda
Orden:	Cladocera
Familia:	Daphnidae
Genero:	Daphnia

Daphnia. presenta una forma oval, sin segmentación externa. El caparazón cubre total o parcialmente el cuerpo y generalmente termina la parte posterior en una espina caudal. La cabeza que no es cubierta por el caparazón se proyecta ventralmente en un corto pico y presenta un par de antenas birramosas que utilizan para la natación. Estos movimientos son generalmente verticales y espasmódicos (Lewis & Maki, 1981; Goulden et al., 1982).

El tórax presenta apéndices en número de 5 o 6 pares. Están adaptados para filtrar el alimento que llega a través de los movimientos del animal. Las sedas que presentan retienen a organismos (generalmente pertenecientes al nanopláncton) y partículas muy finas (menores de 30 micras), inclusive bacterias. Además, estos apéndices torácicos presentan adaptaciones para la función respiratoria (Tortorelli et al., 1990).

Cuando se encuentra en un medio bien aireado son incoloros, pero cuando el mismo presenta deficiencia de oxígeno se tornan de color rojo ya que poseen hemoglobina.

En su ciclo de vida presentan mudas pero no metamorfosis. El crecimiento del cuerpo ocurre inmediatamente después de la muda.

Cuando las condiciones son favorables para la vida de estos organismos, la reproducción en general es partenogenética (asexual), es decir que la población se encuentra formada exclusivamente por las hembras que producen por mitosis huevos con un número diploide de cromosomas ($2n$), de los cuales se forman nuevas hembras partenogenéticas. Cuando las condiciones ambientales se tornan desfavorables, algunas hembras partenogenéticas producen por meiosis huevos n (número haploide de cromosomas), de los cuales se forman machos con el mismo número de cromosomas.

Al mismo tiempo otras hembras producen huevos más grandes con mayor cantidad de reservas. Su número es menor comparado con los partenogenéticos. Estos también presentan el mismo número de cromosomas que los machos (n). Cuando estos fecundan a las hembras, se forman en la cámara de cría de estas últimas, huevos de resistencia o efipios.

El efipio es un huevo oscuro de paredes gruesas que posee dos huevos más grandes que los partenogenéticos y presentan mayores reservas. Estas características los hacen soportar condiciones ambientales muy desfavorables (sequías, anoxias, bajas temperaturas, etc.).

Cuando las condiciones para el desarrollo de estos organismos vuelven a ser óptimas, a partir de estos dos huevos podrían generarse dos nuevas hembras diploides ($2n$), pero con una dotación distinta a la de su madre. Los mecanismos fisiológicos por los cuales se desencadena este fenómeno todavía son desconocidos (Tortorelli et al., 1990). El crecimiento es rápido, siendo completado en menos de un minuto como se registró en *D. magna* (Tortorelli et al., 1990). Una vez que este se ha endurecido no hay incremento de tamaño hasta después de la siguiente muda. Se pueden reconocer cuatro periodos en el ciclo de *Daphnia*; huevo, juveniles, adolescente y adulto. El periodo de huevos se desarrolla completamente dentro de la cámara de cría de la madre. Los juveniles de *Daphnia* nacidos por partenogénesis, son liberados desde las cámaras de crías de las madres y presentan un aspecto similar al de adultos inmaduros. El periodo juvenil presenta entre 4 a 5 estadios.

El adolescente es breve y el número de estadios varía entre 1 o 2; es en este periodo donde se desarrolla la primera camada de huevos dentro del ovario. El adulto, en cambio, es el que presenta mayor número de estadios. La aparición de la función reproductiva es la que marca el comienzo de este último periodo (Tortorelli et al., 1990).

El número de jóvenes producidos por hembra también varía entre cada especie y de acuerdo al estado del individuo y su edad, *D. magna* puede llegar a producir como máximo 30 juveniles por camada, pero normalmente el número de crías varía entre 6 a 10 (Tortorelli et al., 1990)

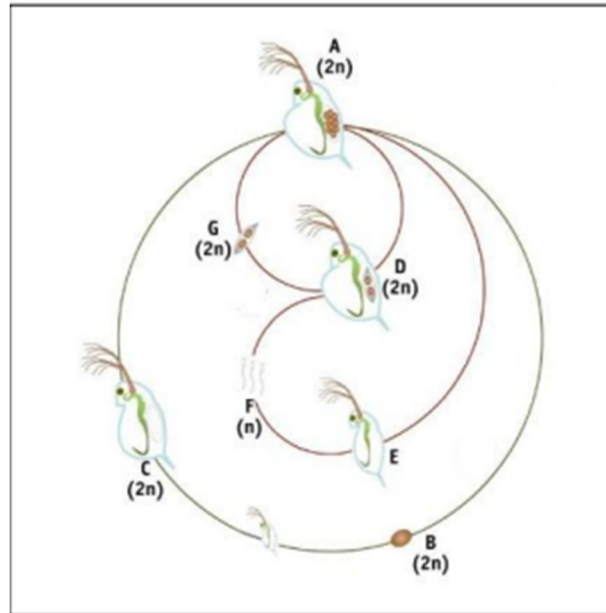


Imagen 3: Ciclo de Daphnia magna. En Donde ABC corresponde al ciclo asexual y AEDG incluye ciclo sexual.

Fuente: <https://projectodaphniamagna.blogs.sapo.pt/3277.html>

Ensayos de toxicidad

A lo largo del tiempo, se han desarrollado distintos tipos de ensayos de toxicidad, que se define como el método utilizado para detectar y evaluar la capacidad inherente a un agente en producir efectos tóxicos sobre organismos vivos. Su principal objetivo, además de la obtención de datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es la caracterización de la relación dosis-respuesta para el agente (Larraín, 1996). Por otro lado, un bioensayo corresponde al método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente químico sobre organismos vivos, a través de la comparación de este agente con el efecto de una solución patrón o estándar (Tortorelli et al., 1990).

Las principales diferencias entre ellos están centradas en las concentraciones de tóxico empleadas y en la longitud de la exposición al mismo. Sin embargo, todos los ensayos tienen algunas características que les son comunes:

a) Exposición al tóxico de grupos de organismos, pertenecientes a la misma población, en buenas condiciones de salud, aclimatados previamente a las condiciones del ensayo.

b) Organismos mantenidos en condiciones ambientales y estandarizadas (calidad de agua, pH, salinidad) antes y durante el ensayo.

c) Exposición a concentraciones graduadas del agente tóxico, seleccionadas apropiadamente.

d) Disposición de grupos de control adecuados.

e) Durante y al final de la exposición, una observación minuciosa de los signos de toxicidad presentes.

f) Medición y registro detallado de los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados.

g) Apropiado análisis estadístico de los datos obtenidos.

Según Tortorelli et al. (1990), de acuerdo al tiempo de exposición del tóxico, los bioensayos se clasifican en:

1. Ensayos agudos: Se da un corto periodo de exposición al tóxico en relación al periodo de generación de la especie de prueba; se los utiliza, generalmente para

evaluar vertidos esporádicos de efluentes en un punto determinado. La respuesta a analizar es el efecto agudo, es el cual es efecto causado por la acción de una sustancia sobre organismos vivos, que se manifiesta rápida y severamente; se produce en un corto periodo de tiempo de exposición generalmente (entre 0 a 96). Sin embargo, el tiempo de exposición dependerá del organismo a ensayar.

2. Ensayos crónicos: La toxicidad crónica es la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos en un organismo debido a una exposición continua o repetida a cantidades relativamente bajas de la misma, durante un periodo prolongado. Las exposiciones repetidas pueden provocar acumulación del agente tóxico en el organismo, lo cual a su vez puede causar la aparición de efectos crónicos.

Desviación estándar: La desviación estándar es la medida de dispersión más común, que indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la media.

Mientras mayor sea la desviación estándar, mayor será la dispersión de los datos.

Varianza: La Varianza es una medida de dispersión que se utiliza para representar la variabilidad de un conjunto de datos respecto de la media aritmética de los mismo.

Test Dunnett: Se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para las diferencias entre la media de cada nivel de factor y la media de un grupo de control. Si un intervalo contiene el cero, no hay diferencia significativa entre las dos medias que están comparándose. Mientras que en ANOVA (Análisis de la

Varianza) es una fórmula estadística que se utiliza para comparar las varianzas entre las medias (o el promedio) de diferentes grupos.

LOAEC: corresponde a la dilución más baja de la muestra en el cual se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el promedio de crías nacidas por hembra, con respecto al grupo control.

NOAEC: corresponde a la dilución más alta ensayada de la muestra en la cual no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el promedio de crías nacidas por hembra, con respecto al grupo control.

2.2 MARCO EMPIRICO.

Toxicidad y Genotoxicidad del compuesto amonio cuaternario cloruro de Benzalconio (BAC) usando *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia* como sistemas modelo.

Lavorgna, Margarita., DAbrosca, Brígida, Parella., Alfredo.,

País: Italia.

Año: 2015

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto general del cloruro de benzalconio en dos crustáceos de agua dulce. *D. magna* y *C. dubia* se utilizaron en pruebas estándar para detectar la toxicidad aguda y crónica, mientras que las células de dáfidos completos se expusieron *in vivo* a BAC para detectar la genotoxicidad en el ensayo de electroforesis en gel unicelular. Para establecer posibles diferencias entre las concentraciones nominales y reales, también se investigó la concentración de BAC en las soluciones de prueba.

Las pruebas agudas se realizaron en dos experimentos independientes, cinco concentraciones de prueba y cuatro réplicas por cada concentración desde 100 µg/L (factor de dilución 3) para *D. magna* y siete concentraciones de prueba y tres réplicas de 1000 µg/L (factor de dilución 3) para *C. dubia* en la oscuridad, durante 48 y 24 h, respectivamente, sin alimento. Se realizaron pruebas preliminares de búsqueda de rango (factor de dilución = 10) usando cinco concentraciones de BAC para identificar el rango de concentración que se usará en las pruebas definitivas.

Se realizaron pruebas crónicas en dos experimentos independientes con organismos expuestos individualmente en vasos de vidrio, seis concentraciones de prueba y diez repeticiones por cada concentración desde 6 µg/L (factor de dilución 3) para *D. magna* y de 90 µg/L (factor de dilución 3) para *C. dubia*, aproximadamente una quinta parte de los valores de EC50 agudos respectivos. *c_ Las pruebas de inhibición del crecimiento de la población de dubia* (ISO, 20665, 2008) se realizaron durante 7 días a 25 °C con un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 h (600 lux). *D. _ Las pruebas magna* se realizaron durante 21 días de exposición según OECD 211 (2008) a 20 °C con el mismo ciclo de luz:oscuridad.

Los resultados se analizaron utilizando el software ToxRat Professional, versión 2.10.05 (Aldorf, Alemania) para calcular el porcentaje efectivo para cada dilución. A continuación, Prism5 (Graphpad Inc., CA, EE. UU.) reunió los resultados para estimar, mediante regresión no lineal (log agonista *frente a* pendiente variable de respuesta normalizada), la dilución que proporciona un efecto del 50 %.

La absorción a 550 nm reveló una diferencia no apreciable entre las concentraciones nominales y reales al comienzo de cada prueba. Las concentraciones de BAC divergieron de las concentraciones nominales en un máximo del 14 % a las 24 y 48 h en la oscuridad (ensayos agudos y de genotoxicidad) mientras que, en presencia de algas (ensayos crónicos), la BAC experimentó una reducción del 18 % y del 20 % a las 24 y 48 h, respectivamente. Según lo informado por Li (2012), cuando las concentraciones reales son al menos el 80% de las concentraciones nominales, las concentraciones

medidas y esperadas se consideran muy cercanas, por lo que en el presente estudio las concentraciones efectivas se informaron como concentraciones nominales.

Los resultados del presente estudio mostraron que BAC tiene un fuerte potencial tóxico en dáfnidos, especialmente en respuestas a largo plazo, en *D. grande*. La evaluación de la ecotoxicidad de BAC aún es fragmentaria para exposiciones a largo plazo y necesita más estudios en otros organismos de diferentes cadenas alimentarias para mejorar el conocimiento de los contaminantes identificados como compuestos peligrosos. Además, la evidencia de un claro efecto genotóxico en los mismos organismos sensibles a bajas concentraciones de BAC debería reunir más datos para evaluar el riesgo general que representa para el medio ambiente y, en consecuencia, para la salud humana. Además, considerando las propiedades químicas de los BAC y de los QAC en general, su biodisponibilidad podría desempeñar un papel importante, así como las posibles interacciones con otros productos químicos, en la modificación de la toxicidad real de dichos compuestos.

EFFECTO DE UN DETERGENTE BIODEGRADABLE EN AGUA EN LA REPRODUCCION DE DAPHNIA MAGNA.

Autor: Castiglioni, M. & Collins, P.

País: Argentina

Año: 2010

El objetivo del presente trabajo es observar cómo afecta un formulado comercial de detergente biodegradable sobre la capacidad reproductiva de *D. magna*. Esto se realizó a partir de ensayos crónicos en individuos aislados y agrupados utilizando tres concentraciones subletales de un detergente aniónico, por lo que previamente se determinó la CL₅₀ el ensayo duró 21 días, registrando diariamente los neonatos nacidos. Estos fueron contabilizados y retirados para su medición. En los bioensayos crónicos, los individuos aislados en el control produjeron 262 huevos, siendo similar a las dos concentraciones inferiores. La puesta de huevos y la obtención de neonatos viables en aquellos ejemplares aislados fue mayor en la concentración superior que en las menores, y éstas más que en el control. Asu vez, en la experiencia con ejemplares agrupados, el incremento en el número de huevos fue progresivo a la concentración del detergente. El detergente promovió una producción de descendencia más abundante y viable. Esto podría asociarse a que el detergente permitiría una más eficaz utilización del recurso trófico y biodisponibilidad de energía para reproducirse al desagregar las partículas o las células algales ofrecidas como alimento.

La supervivencia en el ensayo agudo disminuyó con el tiempo, determinando a las 48 h el valor de CL ($0,1416 \pm 0,0008$ mL/L) 50 en el cladóceros *D. magna* expuesto al formulado de detergente biodegradable de uso masivo y comercial

Las tallas de los neonatos en los diferentes eventos reproductivos del grupo control manteniendo los progenitores aisladamente fueron similares, siendo solo el 19,9 % mayor en aquellos neonatos eclosionados en la última camada producida. Mientras que aquellos neonatos eclosionados en los eventos reproductivos con distintas concentraciones de detergente no fueron diferentes dentro de cada grupo. Comparando las medidas tomadas en los neonatos (ec, a, c y Lt), el grupo control en general fue mayor significativamente que aquellos expuestos a las concentraciones de detergente.

CAPITULO III: METODOLOGIA.

3.1 MATERIAL Y METODO.

Producto desinfectante Potenza

Se utilizó producto comercial cuyo efecto es la desinfección de superficies que contiene 4 tipos de amonios cuaternarios de cuarta generación y etanol al 95%. Las muestras se mantuvieron almacenadas en matraces de 100 ml refrigeradas a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Bioensayos a través de *Daphnia magna*

*Cultivos de *Daphnia magna**

Se utilizó *Daphnia magna*, obtenida desde cultivos del Laboratorio de Bioensayos del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile de la Universidad de Concepción. Los cultivos se realizaron según el procedimiento de normativa chilena (NCh2083. Of 1999). Se prepararon las soluciones de agua reconstituida, de dilución y de cultivo agregando NaHCO_3 (2,59 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (4,93 g/L), KCl (0,23 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,76 g/L) a 1 L de agua destilada (NCh 2083. Of 1999) y con un contenido de oxígeno disuelto mayor al 80% (EPA, 1993). El medio fue renovado tres veces por semana, y los cultivos fueron alimentados de acuerdo a Xavier et al. (2005).

Cultivos de microalgas (Chlorella vulgaris y Selenastrum capricornutum)

Se utilizó *Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum* obtenidas desde cultivos del Laboratorio de Ficología de la Universidad de Concepción, como fuentes de alimento para *D. magna*. Los cultivos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de USEPA (1993). En ambos medios cada una de las sales fue disuelta en 0,5L de agua mili Q y esterilizada a 121° C por 30 min en el equipo de autoclave Tempra, modelo TMQ CV 3870. Las microalgas se incubaron en matraces erlenmeyer de 1L a 23±2 °C bajo luz de espectro blanco en un fotoperiodo de 18 h luz y 8 h de oscuridad.

Determinación de la toxicidad aguda del producto desinfectante potencia

Se evaluó la toxicidad aguda del producto desinfectante potencia, utilizando neonatos de *D. magna*, menores a 24 h de vida. Cinco de estos organismos fueron depositados en vasos plásticos, conteniendo 10 mL de producto a distintas concentraciones durante 24 y 48 h, sin recambio ni alimentación. Las concentraciones ensayadas correspondieron a diluciones expresadas en porcentaje: 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001 y 0,0000001%. Pasado ese tiempo, se evaluó la mortalidad de los organismos (LC50 24 y 48 horas). El ensayo fue realizado en cuadruplicado y los datos fueron analizados mediante programa analítico PROBIT (USEPA 1993). Las condiciones del ensayo se observan en la tabla 2

Tabla 2. Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

Bioensayo Agudo	Características
Duración de la prueba	24 – 48 horas
Temperatura	20 ± 0,2° C
Fotoperiodo	16 horas luz; 8 hrs oscuridad
Tamaño de la cámara de prueba	30 m.
Volumen de la solución de prueba	25 ml.
Edad de los organismos	Neonatos menores a 24 hrs
Numero de organismos por cámara	5
Numero de replicas por concentración	4
Numero de organismos por concentración	20
Agua de dilución	Agua reconstituida: Dureza: 250 mg/L ± 25 mg/L, expresada como CaCO ₃ ; pH: 7,8 ± 0,2; OD: sobre 80% de saturación.
Criterio de toxicidad	Mortalidad LC ₅₀
Criterio de aceptabilidad	Sobrevivencia de controles sobre un 90%

Determinación de toxicidad crónica en Daphnia magna

En primer lugar, se determinó la concentración letal (LC50) del producto desinfectante potencia sobre *Daphnia magna*, utilizando concentraciones que no produjeron mortalidad en los dáfnidos, bajo LC50 obtenidas en el ensayo agudo. Posteriormente, se determinó la toxicidad crónica del efluente. Para esto, neonatos de *D. magna* fue expuestos durante 21 días a un gradiente de concentraciones en donde nuestro 100% fue bajo al LC50 (en este caso 0,00001% obtenido y de ahí se realizó un gradiente de concentraciones (100%; 50%; 25%,12,5% y 6,25%) y agua de recambio como control. Se utilizó 1 neonato por tratamiento. Lunes, miércoles y viernes se realizó recambio de agua, agregando 3 ml de un cultivo de *Chlorella vulgaris* y 3 ml de *Selenastrum capricornutum* y 3 ml de alimento preparado (12,5 g harina de pescado, 5,2 g de levadura y 1 g de alfalfa en 1 Litro de agua easy-well), eliminando antes los neonatos nacidos por cada organismo. El ensayo se realizó a temperatura y fotoperiodo controlados ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 16 hrs luz–8 hrs oscuridad). Se realizaron 10 réplicas por cada tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados para determinar la concentración efectiva o concentración máxima de efecto no observado (NOEC) y la concentración mínima de efecto observado (LOEC), a través de estadístico Toxstat (EPA, 1993). Las condiciones del ensayo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de ensayo y criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad crónica con *Daphnia magna*.

Bioensayo cronico	Características
Duración de la prueba	21 días
Temperatura	20 ± 0,2° C
Fotoperiodo	16 horas luz; 8 hrs. oscuridad
Régimen de alimentación	Cada 48 hrs.
Edad de los organismos	Neonatos menores a 24 hrs
Numero de organismos por cámara	1 neonato
Numero de replicas por concentración	10
Agua de dilución	Agua reconstituida: Dureza: 250 mg/L ± 25 mg/L, expresada como CaCO ₃ ; pH: 7,8 ± 0,2; OD: sobre 80% de saturación.
Efecto	Reproducción y crecimiento
Criterio de aceptabilidad	Sobrevivencia de controles sobre un 90%

3.2 DESARROLLO

Identificación de la composición del producto.

El desinfectante líquido a base de amonio cuaternario de cuarta generación se encuentra constituido por una mezcla de 4 amonios y etanol al 95%.

¿Cuáles serían estos amonios cuaternarios de cuarta generación y sus características?

- Cloruro Alquil Dimetil Bencil Amonio.
- Cloruro Octil Decil Dimetil Amonio.
- Dioctil Dimetil Amonio Cloruro.
- Didecil Dimetil Amonio Cloruro.

Estos son tipos de desinfectantes, bactericidas, tensioactivos e inhibidores de microorganismos que se pueden hallar en las superficies. Además, que presentan acciones fungicidas sobre algunas bacterias. Estos productos cuaternarios con cadenas dialquílicas lineales y sin anillo bencénico. Estos cuaternarios son superiores en cuanto a actividad germicida, son de baja espuma y tienen una alta tolerancia a las cargas de proteína y al agua dura.

Su uso puede ser tanto como industrial, en recintos de salud o domiciliarios en bajas concentraciones, pueden ser corrosivo a los ojos y se ha identificado toxicidad en peces.

Etanol

El etanol, también llamado alcohol etílico, es un compuesto químico orgánico alifático con un grupo funcional hidroxilo, formando parte de la familia de los alcoholes, de fórmula empírica C_2H_6O . Es un alcohol que en condiciones normales de presión y temperatura se presenta como un líquido incoloro, con un olor etéreo muy penetrante, similar al ácido acético y es muy inflamable. Tiene una temperatura de ebullición de $78.4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Composición producto potencia

Mezcla de amonios para un volumen total de 500 ml.

cuaternarios.....0,48% p/v

Etanol 95%.....72% p/v

Ingredientes inertes100 ml

Análisis de los parámetros fisicoquímicos del producto.

Tabla 4. Parámetros físico-químicos producto desinfectante potencia.

Análisis	Muestra pura	Muestra diluida
PH	6,25	7,99
Conductividad	7,58 ms/cm	567 us/cm
Saturación Oxígeno	0,2% OD	97,8% OD
Color	Transparente	Transparente
Olor	Olor fuerte	Inoloro
Dureza	Indeterminada	178 CaCO3Mg/L

Ensayos de toxicidad

Toxicidad aguda

Con el propósito de determinar presencia de toxicidad aguda en el producto desinfectante potencia en estudio, se determinaron valores de LC50 (concentración del efluente en la que se muere el 50% de la población de organismos de prueba) y así evitar posteriormente en el ensayo crónicos se registre mortalidad de organismos.

CAPITULO IV: PRESENTACION DE LOS RESULTADOS

4.1 RESULTADOS

Tabla 5. Resultados Bioensayo agudo 24 horas.

Resultados 24h.						
Nº de Réplicas	Tipo de tratamiento: Diluciones (%)					
	Control	0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
Réplica 1	0/5	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5
Réplica 2	0/5	0/5	1/5	3/5	5/5	5/5
Réplica 3	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5
Réplica 4	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5	5/5
Total <i>D. magna</i> Inmóviles	0/20	0/20	2/20	9/20	20/20	20/20

Tabla 6. Resultados Bioensayo agudo 48 Horas.

Resultados 48h.						
Nº de Réplicas	Tipo de tratamiento: Diluciones (%)					
	Control	0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
Réplica 1	0/5	0/5	0/5	3/5	5/5	5/5
Réplica 2	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5	5/5
Réplica 3	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5	5/5
Réplica 4	0/5	0/5	2/5	3/5	5/5	5/5
Total <i>D. magna</i> Inmóviles	0/20	0/20	4/20	16/20	20/20	20/20

0,000001= Muestra diluida cien mil veces.

0,00001= Muestra diluida diez mil veces.

0,0001= Muestra diluida mil veces.

0,001= Muestra diluida cien veces.

0,01= Muestra diluida diez veces.

Parámetros	Unidad	Identificación de la muestra
		Potenza
Toxicidad aguda 24 h CI50	%	0,00025
Toxicidad aguda 48 h CI50	%	0,00014

Tabla 7. LC50 a las 24 horas y 48 horas.

Se determinó que la solución stock para la realización del bioensayo crónico fuera de 0,00001% ya que se observó un CI₂₀ en dicha concentración.

Las diluciones utilizadas luego de preparar la respectiva solución stock de la muestra fueron del 6,25%, 12,5%, 25%, 50% y 100% de dilución

Toxicidad crónica

Tratamiento (% o mg/L)	Volúmen (mL)		Promedio	S.D	Varianza	Valor t (test Dunnnett)
	Muestra	Agua de dilución				
Control	0	400	59,8	2,7	7,5	
6,25%	25	375	43,8	2,4	5,7	14,9*
12,5%	50	350	40,0	2,3	5,1	18,4*
25%	100	300	37,5	2,8	7,8	20,7*
50%	200	200	33,3	1,7	2,9	24,6*
100%	400	0	30,6	2,4	5,6	27,2*

Tabla 8. Valores promedio de neonatos producidos por D. magna, desviación estándar, varianza y valor T del test de Dunnnett.

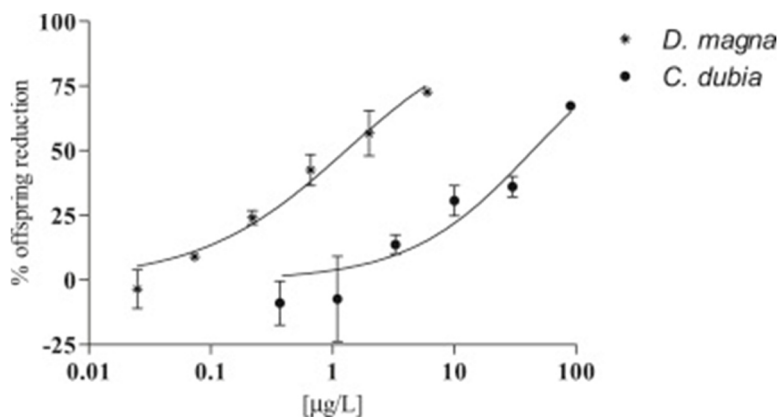
En los bioensayos crónicos de D. magna con la muestra Potenza se registró un *LOAEC de 6,25% y un *NOAEC < 6,25% de dilución para la muestra.

*LOAEC: corresponde a la dilución más baja de la muestra en el cual se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el promedio de crías nacidas por hembra, con respecto al grupo control.

*NOAEC: corresponde a la dilución más alta ensayada de la muestra en la cual no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el promedio de crías nacidas por hembra, con respecto al grupo control.

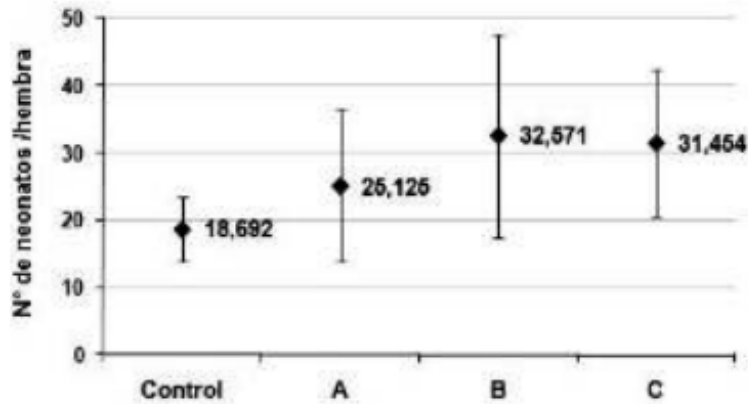
CAPITULO V: DISCUSIÓN

El mal y excesivo uso de algunos desinfectantes químicos tuvo un alza durante la pandemia sin saber el daño al ecosistema, según los resultados demostrados y presentados anteriormente comprueban este daño al ecosistema, no solamente por la alta letalidad que tiene el químico estudiado, sino por los daños crónicos que fueron demostrados. Si se comparan los resultados obtenidos con el estudio “Toxicidad y Genotoxicidad del compuesto amonio cuaternario cloruro de Benzalconio (BAC) usando *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia* como sistemas modelo.” se puede evidenciar una disminución en la reproducción de estas, en las concentraciones más elevadas, como lo muestra el grafico en la tabla siguiente.



Concentraciones que dan inhibición de la reproducción

Mientras que, si se compara con el estudio de Castiglione, M., Collins, P de “EFECTO DE UN DETERGENTE BIODEGRADABLE EN AGUA EN LA REPRODUCCION DE DAPHNIA MAGNA.” Podemos observar que sucede todo lo contrario ya que se puede encontrar un producto biodegradable y así comprobar que si se utilizan productos amigables con el medio ambiente, el impacto es mucho menos, e incluso hasta positivo para el ecosistema



Numero medio y desvió de neonatos de Daphnia Magna expuesto a 3 concentraciones (A: 0,03; B: 0,06; C: 0,10 mL•L)

CAPITULO VI: CONCLUSION

El producto desinfectante potencia presenta una alta toxicidad aguda sobre D. magna, ya que al determinar su LC50 a las 48 horas se obtuvo un valor de 0,000059%, por lo que el producto desde un 0,001% hasta el 100% de él tiene una letalidad total de la población de Daphnias.

Daphnia magna es un organismo primario dentro de la cadena trófica, por lo que su disminución puede causar un impacto a los seres vivos de niveles superiores, pudiendo causar un daño grave al ecosistema acuático, ya que no solamente se eliminan estos productos de uso domiciliarios o de recintos de salud, sino también la actividad industrial elimina sus desechos, aunque tratados pueden causar una bioacumulación en los seres vivos.

Respecto a la hipótesis planteada se puede afirmar que esta se cumple, de acuerdo con los resultados obtenidos ya que se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el nivel de toxicidad agudo y crónica de la población de Daphnias Magnas respecto al desinfectante potencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Antiseptics and disinfectants: aiming at rational use. Recommendations of the Advisory Committee on Healthcare Associated Infections. Sociedad Chilena de Infectología. *Revista chilena de infectología*, 34(2), 156-174. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
- Castiglioni, M., Collins, P
Efecto de un detergente biodegradable en agua en la reproducción de daphnia magna
[The Biologist](#), ISSN-e 1816-0719, [Vol. 8, Nº. 1, 2010](#), págs. 43-53
- Diomedi, Alexis, Chacón, Eiana, Delpiano, Luis, Hervé, Beatrice, Jemenao, M. Irene, Medel, Myriam, Quintanilla, Marcela, Riedel, Gisela, Tinoco, Javier, & Cifuentes, Marcela. (2017).
- Lewis, M.. & Maki, A.. 1981 "Effects of Water Hardness and Diet on Productivity of Daphnia magna Strauss, in Laboratory Culture", *Hydrobiology*, 85: 175-179.
- . Margherita Lavorgna, Chiara Russo, Brigida D'Abrosca, Alfredo Parrella, Marina Isidori,
Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using Daphnia magna and Ceriodaphnia dubia as model systems,
Environmental Pollution, Volume 210,2016, Pages 34-39,

- NUNEZ, Mónica y HURTADO, Jasmin. Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Rev. peru biol. 2005
- Tortorelli, M. Di Marzio, W. Sáenz, M. & Alberdi, J. 1090. Ensayos ecotoxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de contaminación ambiental. Laboratorio de Ecotoxicología, Universidad de Luján. Argentina. 749pp.