

EVALUACIÓN DE LOS RESIDUALES DE MICOTOXINAS Y SUS EFECTOS AMBIENTALES (PARTE II)

Ing. Neyda Pérez-Garrido¹ neyda@toxi.scu.sld.cu, Dra. Yudith González-Díaz^{II},
yudith@fiq.uo.edu.cu, Lic. George Argota-Pérez^I; Lic. Yuleidis González-Pérez^I,
Lic. José Carlos Rodríguez-Tito^I

¹Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Santiago de Cuba, ^{II}Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba

*En este artículo se realizan ensayos ecotoxicológicos con el objetivo de inferir el efecto que los residuales de micotoxinas pueden tener sobre el ecosistema a partir del efecto que produzca sobre una población de organismos que forme parte fundamental de la cadena trófica. Los ensayos ecotoxicológicos en *Brachidanio rerio*, demostraron que la mortalidad fue del 100% de los peces en las concentraciones 10, 20 y 30 % del residual sólido y en el 5 % en el caso del residual líquido. En el estudio con *Eisenia andrei* existió repelencia en los cuatro tratamientos durante las primeras 24 h indicando que la concentración y toxicidad del residual son proporcionales. También se demostró que la CL50 está estimada entre 1,5 g y 2.0 g del residual sólido. Al evaluar las distintas concentraciones del residual líquido (0.1, 1, 10, 100 %) en el experimento de la *Artemia sp*, se pudo observar que existe una relación directamente proporcional entre la mortalidad y los niveles de concentraciones probados; evidenciándose el máximo efecto a partir de la concentración del 1 % con un 100 % de mortalidad. Quedando demostrado que los residuales obtenidos en la técnica de micotoxinas tienen efectos tóxicos tanto para los medios acuáticos, como para los terrestres.*

Palabras clave: micotoxinas, ensayos ecotoxicológicos, *artemia sp*, concentración letal.

*In this article ecotoxicological tests are performed in order to infer the residual effect of mycotoxins may have on the ecosystem from the effect it produces on a population of organisms that form a fundamental part of the food chain. The ecotoxicological tests on *Brachidanio rerio*, showed that mortality was 100 % of the fish at concentrations 10, 20 and 30 % of solid waste and 5 % in the case of residual liquid. In the study with *Eisenia andrei* repellency existed in the four treatments during the first 24 hours indicating that the concentration and residual toxicity are proportional. It was also shown that the LC50 is estimated between 1.5 g and 2.0 g of residual solid. When evaluating the different levels of residual liquid (0.1, 1, 10, 100 %) of *Artemia sp* experiment, it was observed that there is a direct relationship between mortality and the concentration levels tested, evidencing the maximum effect from the concentration of 1% with 100 % mortality. This clearly demonstrates that the residuals obtained in the art of mycotoxins are toxic to both aquatic and for the land.*

Key words: mycotoxins, ecotoxicological tests, *artemia*, lethal concentration.

Introducción

En el artículo anterior (parte I), los autores expusieron la determinación a través de los métodos físico-químicos de los parámetros más significativos en el análisis medioambiental de los residuales de micotoxinas. En el presente artículo se completa la evaluación medioambiental mediante el empleo de ensayos ecotoxicológicos.

Es de mucho interés en la Toxicología actual el estudio de los efectos sobre la salud humana de la exposición a bajas concentraciones de sustancias químicas. Esta exposición a bajos niveles muchas veces está relacionada con la aparición de efec-

tos crónicos y con el desarrollo de enfermedades aparentemente no vinculadas a factores tóxicos. Uno de los grupos de sustancias a los que más atención se les brinda a nivel mundial en la actualidad es el de las micotoxinas.

Los residuos generados por el Laboratorio de Química Analítica del Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) contienen micotoxinas y son vertidos sin tratar al medio ambiente.

En este artículo se realizan ensayos ecotoxicológicos con el objetivo de inferir el efecto que los residuales de micotoxinas pueden tener sobre el ecosistema a partir del efecto que produzca sobre una población de organismos que forme parte

fundamental de la cadena trófica (bacterias, algas, invertebrados, peces).

Los efectos biológicos que se producen en los ensayos se pueden definir de varias formas, que van a ser los parámetros que se utilicen para determinar la toxicidad. A continuación se definen dos de los parámetros más usados:

1. Concentración efectiva (CE_x): concentración del efluente que produce efectos negativos apreciables en un porcentaje "x" de la población de ensayo. Se usa el CE_{50} o EC_{50} , que sería la concentración efectiva que afecta al 50 % de la población.
2. Concentración letal (CL_x): concentración del efluente que produce la muerte de un porcentaje "x" de la población de ensayo. Se usa el CL_{50} o LC_{50} , que sería la concentración letal que mata al 50 % de la población.

Para emplear y utilizar los resultados de los ensayos de toxicidad se emplean las unidades de toxicidad (UT), que son las que se utilizan como criterio base de la normativa.

Fundamentación teórica

Los contaminantes químicos generados y vertidos al ambiente pueden causar efectos muy variados, ya sea sobre los organismos aislados (efectos tóxicos), o sobre los ecosistemas y el equilibrio ambiental general (efectos ecotóxicos) los cuales pueden ser inmediatos o a largo plazo y afectar generaciones posteriores. Así como efectos adversos de tipo estético, económico, social y político. Por lo general ocurren en lugares cercanos a la fuente de contaminación (efectos microambientales). También pueden ocurrir en sitios remotos y tienen mayormente implicaciones globales (efectos macroambientales).

La evaluación medioambiental es un concepto de gran importancia y a la vez muy complejo. Son muy numerosos los métodos existentes para llevar a cabo el muestreo y el análisis de muestras ambientales, recurriéndose habitualmente a criterios internacionales de orígenes diversos. La evaluación implica la utilización de numerosas herramientas con el objetivo último de conocer y valorar

una situación, permitiendo el posterior planteamiento de actuaciones. Los métodos concretos y técnicas más usadas en la determinación de los parámetros más significativos en el análisis medioambiental son los métodos físico-químicos y los métodos biológicos

Dentro de los métodos físico-químicos se emplean técnicas químicas y técnicas instrumentales.

Por métodos biológicos de análisis medioambiental podríamos entender todos aquellos métodos que emplean organismos vivos o elementos de éstos con el fin de evaluar la contaminación de un entorno concreto. Se pueden establecer tres grandes grupos de ensayos biológicos:

- Ensayos toxicológicos.
- Exámenes microbiológicos.
- Análisis biológico en sentido estricto

Los ensayos toxicológicos tienen por objeto establecer los efectos desfavorables que produce la dosis de un determinado residuo sobre un organismo concreto durante un tiempo establecido. Los exámenes microbiológicos pretenden determinar la presencia en un medio concreto de agentes peligrosos o potencialmente peligrosos para la salud humana.

El análisis biológico de un entorno tiene por objeto establecer el tipo y estado en que se encuentran las comunidades biológicas que lo habitan, y de este modo poder evaluar la calidad ambiental de dicho medio. En la parte I del artículo se presentan y analiza la evaluación medioambiental por métodos físico-químicos y en la parte II a través de los ensayos toxicológicos.

Métodos utilizados y condiciones experimentales

Se realizó la evaluación de la toxicidad aguda a los residuales de la técnica de determinación de micotoxinas del Laboratorio de Química Analítica de TOXIMED mediante los siguientes bioensayos ecotoxicológicos:

1. Ensayo acuático con peces: pez cebrá (*Brachidanio rerio*)
2. Ensayo terrestre con lombriz de tierra (*Eisenia andrei*)
3. Toxicidad Aguda en *Artemia* sp

Ensayo acuático con peces (*Brachidanio rerio*)

La Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA), ha reconocido al modelo del pez cebrá como una poderosa alternativa a los modelos animales con mamíferos empleados para investigar sobre tóxicos medioambientales. Es por ello que para la evaluación ecotoxicológica del residual, se escogió la Guía OECD 203, la cual está referida a la evaluación de la toxicidad aguda en pez (*Brachidanio rerio*).

Principios del ensayo: durante este ensayo se expone al organismo seleccionado a diferentes concentraciones de muestras problema.

Condiciones experimentales: los peces se aclimataron 24 h antes del estudio en peceras de cristal y sin alimentación durante el período de ensayo. La temperatura del ensayo fue controlada y climatizada a 18 °C. El período de prueba consistió en 96 horas. La concentración estudiada del residual líquido fue 5 % y para el residual sólido las concentraciones del 30, 20, 10 y 5 %, utilizándose como blanco de estudio el agua potable.

Ensayo terrestre con lombriz de tierra (*Eisenia andrei*)

Los bioensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como prueba para evaluar la toxicidad de suelos contaminados /1,6/. La lombriz más utilizada ha sido *Eisenia* en sus especies foetida y andrei, las cuales pertenecen a la familia Lumbricidae.

Principio del ensayo: Este ensayo incluye dos clases de pruebas toxicológicas:

- 1) prueba por contacto con papel de filtro
- 2) prueba con suelo artificial y muestras de suelo contaminado.

La prueba por contacto en papel de filtro puede ser utilizada como preliminar para determinar las concentraciones correspondientes a las que se tiene que llevar a cabo la prueba con suelo, siendo esta última más detallada. La prueba de contacto es fácil de realizar y da resultados reproducibles. El suelo artificial y el suelo contaminado

son representativos de la exposición de la lombriz al compuesto analizado. El ensayo se basa en lo descrito en la guía 207 de la OECD para la evaluación de sustancias /4/.

La prueba por contacto en papel filtro involucra la exposición de las lombrices a sustancias prueba sobre un papel filtro húmedo con la finalidad de identificar el potencial del compuesto tóxico presente en el suelo. Esta prueba tiene una duración de 48 a 72 h.

El uso de suelo artificial involucra colocar las lombrices en un suelo artificial aplicando una serie de concentraciones de la sustancia prueba.

Para que una prueba sea considerada como válida, la mortalidad en el control no debe exceder el 10 % al final del período de exposición.

Condiciones experimentales: El residual sólido de sílice se preparó a diferentes proporciones (0,5 g, 1,0 g, 1,5 g y 2,0 g) mezclándola para su homogeneización con tierra tratada (200 g total entre muestra y tierra) a una textura de granulometría de 0,85 µm y se depositaron en placas petri. Posteriormente a las 24 h se ubicaron las lombrices de tierra en cinco placas petri incluyendo un control negativo. Se seleccionaron 10 lombrices de tierra por tratamiento, donde los parámetros a medir fueron bioensayo de repelencia inmediata a 6 horas y concentración letal 50 (CL₅₀) como toxicidad aguda en un tiempo de 48 h. Igualmente la temperatura del ensayo fue controlada y climatizada a 18 °C.

Toxicidad aguda en *Artemia* sp

Esta prueba está basada en la determinación de la concentración de la sustancia en estudio que provoca la muerte al 50 % de las nauplius (Larvas) de *Artemia* sp, después de 24 h de exposición (CL₅₀24h) además de efectos subletales. Es un ensayo rápido que se realiza en una o dos etapas según sea necesario; una preliminar que proporciona un valor aproximado de CL₅₀ y determina el rango de concentraciones a probar en el ensayo definitivo y una definitiva la cual se realiza en los casos donde el valor aproximado proporcionado por el preliminar no es suficiente. Esta permite

calcular la CL_{50} y determinar el 0 % y el 100 % de mortalidad.

Justificación del método a emplear: En la actualidad existe una tendencia a reemplazar, reducir y/o refinar los métodos que utilizan vertebrados superiores por lo que han surgido una serie de ensayos que emplean otros sistemas biológicos e informáticos, estos son conocidos como los métodos alternativos a la experimentación animal. Muchos de estos métodos, como los que emplean invertebrados, han sido utilizados además desde el punto de vista ecotoxicológico para detectar el impacto de sustancias químicas, residuales y contaminantes en general, en ecosistemas acuáticos, ya que son organismos representativos por ocupar eslabones inferiores de la cadena trófica y cualquier alteración originada por la presencia de un contaminante, tendría repercusión en los organismos superiores. En este grupo de métodos se encuentra el Ensayo de Toxicidad Aguda en *Artemia sp*, excelente para evaluar los efectos de productos químicos y residuales sobre ecosistemas marinos.

Justificación para la selección del sistema de estudio: La *Artemia sp* es un crustáceo que normalmente constituye un excelente alimento para la cría de peces en los sistemas de acuicultura y los ecosistemas marinos naturales. Al ser un organismo representativo de las cadenas tróficas de estos últimos constituye un elemento básico que puede ser empleado con éxito en los bioensayos de ecotoxicidad para conocer los efectos de los productos químicos. La selección del sistema de estudio animal se sugiere entonces sobre la base de criterios prácticos de disponibilidad durante todo el año, fácil mantenimiento, conveniencia para la prueba, entre otros factores relevantes de tipo económico, biológico y ecológico.

Caracterización del sistema de estudio: En este estudio serán utilizados quistes viables de *Artemia sp* suministrados por el Centro de Investigaciones Pesqueras de La Habana.

Condiciones previstas de alojamiento: los quistes son mantenidos en refrigeración (4 °C) y humedad relativa apropiada para su conservación.

El método de administración de la sustancia a probar es por aplicación al agua de dilución de diferentes concentraciones del residual.

Niveles de concentración: Se probaron cuatro concentraciones (0.1, 1, 10, 100 %) aplicadas de manera única, al comienzo del ensayo de toxicidad, cuyo tiempo de duración es de 24 h.

Se realizó el siguiente procedimiento experimental:

1) Incubación de los quistes de *Artemia sp* para la eclosión

Para lograr la eclosión de los quistes de *Artemia sp* se utilizó una cámara de vidrio dividida en dos compartimentos por una lámina con pequeños orificios, garantizando oscuridad en uno de ellos. Se le adicionó agua de mar artificial, aireando a saturación aproximadamente durante 15 min antes de comenzar el experimento, aireación que se mantuvo durante todo el tiempo que duró la incubación. La temperatura se mantuvo en un rango de 27 a 30 °C.

Se pesaron 25 mg de huevos y se le adicionaron al compartimento oscuro de la cámara de eclosión. El otro se iluminó por una lámpara a una distancia de 30 cm de forma paralela a la cámara, con el objetivo de atraer las larvas. Estas al eclosionar pasan a través de los orificios por fototaxia positiva. Alrededor de las 24 h de haber puesto los huevos en el agua debe ocurrir la eclosión dando lugar a larvas nauplius y la migración de estas hacia la recámara iluminada donde se colectan. Se extraen y se cuentan.

2) Ejecución del ensayo. Prueba de toxicidad

Se depositaron 10 nauplius en cada recipiente (vasos de precipitado). El volumen de agua transferido con las nauplius no debe ser superior a 50 µL. Se evaluaron 4 concentraciones de la sustancia de estudio (0.1, 1, 10, 100 %) con tres réplicas cada una, incluyendo un grupo control. Cada recipiente se completa con un volumen de 10 mL de las concentraciones respectivas del tóxico en estudio y se incuban en oscuridad a temperatura de 25 °C por 24 h.

3) Tratamiento de los resultados

Culminado el período de exposición se cuentan al estereoscopio las larvas supervivientes y se anota cualquier comportamiento anormal. Los

efectos sobre la mortalidad se expresan como $CL_{50}24h$, parámetro que se determina por el programa profesional EPA PROBIT. Se realizó además como índice para evaluar la toxicidad del vertido, la determinación de las UT (unidades de Toxicidad). Estas se calculan mediante el siguiente cociente:

$$UT = \frac{100}{CL_{50}} \cdot 100$$

Siendo más tóxico cuanto más UT presente.

Resultados y discusión

Evaluación ecotoxicológica en Pez Cebra

Al exponer los organismos de experimentación a las diferentes concentraciones del residual sólido durante el tiempo de duración del bioensayo (96 h), se observó que para una concentración del

5 % se ocasionó durante las primeras 24 h la muerte del 50 % de los individuos, mientras que las restantes concentraciones del residual sólido (10, 20 y 30 %) reflejaron una mortalidad del 100 % de los individuos a las 24 h, comprobándose la elevada toxicidad del residual sólido. Asimismo, se observó muerte en el 100 % de los peces al exponerlo en contacto con el residual líquido toxicológico intermedio a la concentración del 5 %, lo cual indica que es mucho más letal que el producto residual final (sólido).

Evaluación ecotoxicológica en lombriz de tierra

Al exponer las diferentes concentraciones del residual sólido, se observó que al comparar con el control negativo, existió repelencia de tipo gradual en los cuatro tratamientos durante las primeras 24 h lo cual indica que la concentración y toxicidad del residual son proporcionales (figura 1).



Fig. 1 Repelencia dada la exposición a la sílice mezclada con el sustrato tierra.

Después de las 48 h de duración del ensayo al comparar igualmente con el control negativo, se observó en cada tratamiento mortalidad en las lom-

brices, donde dicha mortalidad aumentó a medida que existe mayor cantidad de sílice mezclada, encontrándose la CL_{50} estimada entre 1,5 g y 2,0 g. (figura 2).

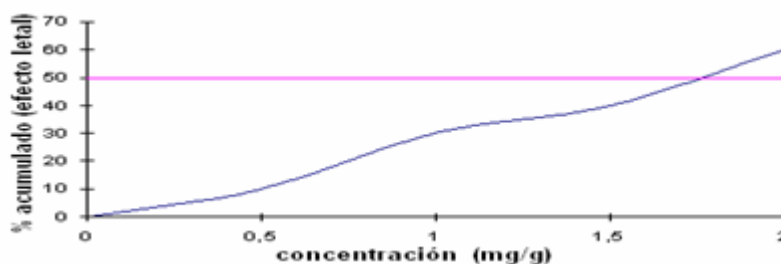


Fig. 2 Curva dosis-respuesta para la sílice mezclada con el sustrato tierra.

lomevaluación ecotoxicológica en Artemia sp

El porcentaje de mortalidad observado en los controles fue menor del 10 % (3,33 %) por lo que se considera válida la prueba.

En la tabla 1 se muestran los resultados

obtenidos al final de los experimentos, donde se puede observar que existe una relación directamente proporcional entre el efecto adverso medido (mortalidad) y los niveles de concentraciones probados; evidenciándose el máximo efecto a partir de la concentración del 1 % con un 100 % de mortalidad.

Tabla 1
Resultados de la prueba de Toxicidad Aguda en Artemia sp

Concentración %	Número de Artemias vivas por pocillo			T	P
	1	2	3		
Control	9	10	10	29	3,3
0.1	1	1	0	2	93,33
1	0	0	0	0	100
10	0	0	0	0	100
100	0	0	0	0	100

donde:

T: Número total de Artemias vivas al final del ensayo

P: % de mortalidad al final del ensayo

Al procesar el experimento con el programa EPA PROBIT se obtuvo el que el valor de la $CL_{50}24h$ es de 0,002 % en un intervalo de confianza del 95 %, y una linealidad aceptable al 5 %.

El cálculo de la UT (Unidad de Toxicidad) fue:

$$UT = \frac{100}{LC_{50}} \cdot 100 = \frac{100}{0,002} \cdot 100 = 500$$

Al analizar los resultados y los datos de UT obtenidos se evidencia que el residual presenta una toxicidad considerable, siendo este criterio presuntivo, ya que cuando se evalúa la toxicidad de una mezcla, hay que tener en cuenta los diferentes efectos que se pueden presentar entre sus componentes: aditivos o sinérgicos, antagónicos, de potenciación o inhibición.

La $LC_{50}24h$ del residual determinada en Artemia sp para el experimento fue de 0,002 %, resultando tóxico para el sistema de prueba porque mientras mayor sea la CL_{50} y menor sea su Unidad de Toxicidad, menor será la toxicidad de la muestra residual.

Conclusiones

Después de haber realizado los estudios toxicológicos a los residuales obtenidos de la técnica de determinación de Micotoxinas en el laboratorio de química de TOXIMED hemos arribado a las siguientes conclusiones:

1. Al exponer el pez cebr a las diferentes concentraciones de los residuales líquidos y sólido durante el tiempo de duración del bioensayo (96 h), se observó que para las primeras 24 h ocasionó:
 - Una mortalidad del 100 % de los individuos a las concentraciones del residual sólido (10, 20 y 30 %).
 - Para una concentración del 5 % del mismo residual, la mortalidad fue del 50 % de los individuos. Comprobándose la elevada toxicidad del residual sólido.
 - De igual forma se observó la muerte en el 100 % de los peces al exponerlo en contacto con el residual líquido toxicológico intermedio a la concentración del 5 %, lo cual indica que es mucho más letal que el producto residual final (sólido).
2. Al realizar el estudio de repelencia en la lombriz de tierra a las diferentes diluciones (0,5 g, 1,0 g, 1,5 g y 2,0 g) del residual sólido, se observó que al comparar con el control nega-

tivo, existió repelencia de tipo gradual en los cuatro tratamientos durante las primeras 24 h lo cual indica que la concentración y toxicidad del residual son proporcionales. También se demostró que a medida que existe mayor cantidad de sílice mezclada mayor es la mortalidad estimándose la concentración letal 50 (CL₅₀) entre 1,5 g y 2,0 g.

3. Al practicar las distintas concentraciones del residual líquido (0,1, 1, 10, 100 %) en el experimento de la *Artemia* sp, se pudo observar que existe una relación directamente proporcional entre el efecto adverso medido (mortalidad) y los niveles de concentraciones probados; evidenciándose el máximo efecto a partir de la concentración del 1 % con un 100 % de mortalidad.

Nomenclatura

°C: grado celsius

CE₅₀ o EC₅₀: concentración efectiva que afecta al 50 % de la población

CENO: concentración de efectos no observables

CE_x: concentración efectiva que afecta al X % de la población

CL₅₀ o LC₅₀: concentración Letal que mata al 50 % de la Población

CL_x: concentración letal que mata al X % de la población

EPA: agencia de protección medioambiental de Estados Unidos

OECD: organización para la cooperación y el desarrollo económico

P: % de mortalidad al final del ensayo

Probit: programa de análisis utilizado para el cálculo de los valores de LC/EC Programa de análisis utilizado para el cálculo de los valores de LC/EC

T: número total de *Artemias* vivas al final del ensayo

TOXIMED: centro de toxicología y biomedicina

UT: unidades de toxicidad

Bibliografía

1. DOM, P. B., T. E. VIPOND J. P. SALANITRO y H. L., WISNIEWSKI. *Assessment of the acute toxicity of crude oils in soil using earthworms, microtox and plants*, Chemosphere 37(5): págs. 845-860, 1998.
2. EPA/600/4-9/027F, *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fourth edition*. Edited by Cornelius I. Weber. august, 1993.
3. MORENO, M. *Toxicología ambiental. Evaluación de Riesgo para la Salud Humana*. McGrawHill. Ed. 1 en Español. págs. 2-7, 2003
4. *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD). Earthworm, acute toxicity tests. Guideline for testing of chemicals N° 207 (adoptado en abril de 1984). OCDE, París, pág. 9, 1984.
5. RAMÍREZ, R. P.; MENDOZA, C. A. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ed. I, 2008.
6. WILSON, J. J., J. HATHCER y J. S. GOUDEY. *Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. Annali dell' Istituto Superiore di Sanità* 38(2): págs. 143-147, 2002.