

DOI: 10.24850/j-tyca-2020-02-08

Notas

Evaluación ecotoxicológica de aguas residuales industriales del Centro de Bioactivos Químicos (Santa Clara, Cuba) en *Artemia* sp.

Ecotoxicological evaluation of wastewaters from Centro de Bioactivos Químicos (Santa Clara, Cuba) in *Artemia* sp.

Osmany Marrero¹, ORCID: 0000-0003-1508-6014

Zoe Castañedo²

Yaset Rodríguez³, ORCID: 0000-0003-3937-2031

Edisleidy Aguila⁴

Mirieisy Seijo⁵

Alex Alberto Dueñas⁶, ORCID: 0000-0002-8603-0694

¹Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba,
omarrero@uclv.edu.cu

²Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba,
zoec@uclv.cu

³Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba,
yasetrodriguezrodriguez@gmail.com

⁴Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba,
eaguila@uclv.edu.cu

⁵Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba,
mirieisys@uclv.edu.cu

⁶Facultad de Ciencias Zootécnicas, Universidad Técnica de Manabí,
Portoviejo, Manabí, Ecuador, alduri81@hotmail.com

Autor para correspondencia: Osmany Marrero, omarrero@uclv.edu.cu

Resumen

La investigación y el desarrollo de bioensayos en la estimación y caracterización de la contaminación es un medio eficaz en la valoración de los potenciales efectos ecotóxicos de las aguas residuales sobre los organismos que habitan los ecosistemas. Estos estudios han contribuido a su amplia utilización en el biomonitoreo de residuos de sustancias químicas al ser liberadas al medio ambiente. El trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos sobre larvas de *Artemia* sp. de aguas residuales sin tratar y procesadas en una planta de tratamiento de aguas residuales, anexa a la planta de producción del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), en Santa Clara, Cuba. Dicha agua residual fue generada en el proceso de producción del ingrediente farmacéutico activo (IFA) furvina y sus compuestos intermedios. Poblaciones de larvas de *Artemia* sp. se expusieron a concentraciones seleccionadas de las dos muestras de aguas residuales, en tiempos de exposición de 24 horas. El valor de CL₅₀ de las dos muestras sólo se estimó debido a que las aguas sin tratamiento produjeron mortalidad total en las cinco concentraciones estudiadas; las aguas tratadas no produjeron mortalidad en las cinco diluciones ensayadas. Se demuestra la detoxificación de las aguas residuales medida a través de la especie bioindicadora ambiental *Artemia* sp.

Palabras clave: *Artemia* sp., ecotoxicología, toxicidad, aguas residuales.

Abstract

The investigation and development of bioassays in the estimation and characterization of the contamination is an effective mean in the evaluation of the potential ecotoxic effects of residuals on the organisms that inhabit the aquatic ecosystems. These studies have contributed to its wide use in biomonitoring of chemical residues when they were released into the environment. The objective of this study was to evaluate the effects of untreated and processed wastewater in a waste treatment plant on *Artemia* sp. larvae, annexed to the production plant of the Chemical Bioactive Center (CBQ) (Santa Clara, Cuba). These residues were generated in the production process of the Active Pharmaceutical Ingredient (IFA) Furvina and its intermediates. Populations of *Artemia* sp. larvae were exposed to selected concentrations of two wastewater samples at 24 hour exposure times. The LC₅₀ value of the two samples was only estimated because the untreated waters produced total mortality in the five concentrations studied, and the treated waters did not produce mortality in the five dilutions tested. The detoxification of the waste water was demonstrated through the environmental bioindicator species *Artemia* sp.

Keywords: *Artemia* sp., ecotoxicology, toxicity, sewage water.

Recibido: 10/02/ 2017

Aceptado: 31/05/2019

Introducción

El desarrollo industrial induce una fuerte reactivación socioeconómica y mejoras en la calidad de vida de la población; sin embargo, puede provocar importantes modificaciones que ocasionan el desequilibrio de ecosistemas, diversas formas de contaminación, y otros problemas ambientales y sociales (Suárez & Molina, 2014).

Las aguas residuales industriales son una de las fuentes de gran impacto en esta problemática. Dependiendo de la actividad industrial será el grado de la carga contaminante; por ende, hay vertimientos que son potencialmente contaminantes a nivel de metales pesados o cargas químicas; otros, que presentan alta carga orgánica, y en unos más se tiene la presencia de sólidos suspendidos. Esta carga contaminante afecta el lugar después de vertidos, ya sea en alcantarillados o cuerpos de agua, sobrepasando los parámetros establecidos por la normatividad; también hay procesos donde se tratan estas aguas residuales, reduciendo el impacto al ambiente (Pardo, 2012; EPA, 2004).

El Programa del Sistema Nacional de Eliminación de las Descargas Contaminantes de EUA ha implementado, para garantizar la protección de la vida acuática, una serie de bioensayos o pruebas biológicas agudas y crónicas, que incluyen algas, peces e invertebrados tanto de agua dulce como marina (EPA, 2002a; EPA,

2002b); todas las pruebas pasaron por una evaluación exhaustiva, que concluyó con la publicación en 2002 de los protocolos actualmente aceptados (EPA, 2002a; EPA, 2002b), los cuales son utilizados para evaluar la toxicidad de los efluentes y así calcular la dilución que debe aplicárseles para poder ser descargados en los ecosistemas acuáticos.

Artemia sp., uno de los organismos medidores ambientales, es una especie que por sus ventajas se ha ido utilizando cada vez más como organismo de prueba en investigaciones fundamentales y aplicadas de ecotoxicología (ICT, 2002; Pino & Jorge, 2010; Manfra, Savorelli, Pisapia, Magaletti, & Cicero, 2012).

El Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), en Santa Clara, Cuba, es un centro de investigación y desarrollo para obtener nuevos productos de uso en la agricultura, ganadería y humanos. Su principal renglón productivo es el ingrediente farmacéutico activo furvina (1-(5-bromo-fur-2-il)-2-bromo-2-nitroetano), el cual, durante su proceso de obtención, genera varios flujos de residuos, que son procesados en una planta de tratamiento de aguas residuales, con el fin de disminuir los niveles de contaminantes. Los tratamientos se basan en procesos químico-físicos, como la dilución y neutralización, para disminuir el carácter tóxico de los flujos de residuos concentrados (Martínez, Van der Bruggen, Negrin, & Alconero, 2012). Al finalizar dichos procesos, estas aguas son guiadas por la red de alcantarillado, para el depósito final en una laguna de oxidación.

Por otra parte, tales residuos se deben verter cuando los niveles de contaminantes estén en los rangos de los parámetros de calidad establecidos en la Norma Cubana sobre Vertimiento de Aguas Residuales a las Aguas Terrestres y el Alcantarillado (Oficina Nacional de Normalización, 2012).

En la actualidad, se desconoce el impacto de estas aguas residuales en las diferentes formas de vida. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el riesgo ecotoxicológico de las aguas residuales de la producción de furvina, mediante la evaluación en el ensayo de toxicidad aguda en larvas de *Artemia* sp.

Materiales y métodos

Se realizó un ensayo de toxicidad aguda en *Artemia* sp., empleando la metodología Artoxkit (2003) y la guía ICT (2002). Se procedió a la obtención de larvas de *Artemia* sp. a partir de huevos desecados obtenidos de Argent Chemical Laboratories, Washington, EUA, que garantizaron las óptimas condiciones de eclosión y poblaciones homogéneas de nauplios.

Los huevos desecados fueron hidratados en placas de Petri mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 15 °C, manteniéndolos bajo estas condiciones durante un período de una hora en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, aquellos huevos que flotaban se desecharon, y el resto se transfirió a una probeta de decantación que contenía agua de mar artificial (AMA), con una fuente de luz de unos 1 000 Lux y burbujeo continuo. Transcurridas 24 horas de la incubación de los huevos en el medio salino reconstituido, se obtuvo una amplia población de nauplios libres, que se emplearon para la prueba de toxicidad.

Preparación del AMA

El agua de mar artificial se preparó a partir de una mezcla de sales según la fórmula de Dietrich y Kalle (1957): 23 g de NaCl; 11g de $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 4 g de Na_2SO_4 ; 1.3 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, y 0.7 g de KCl. Dichas sales se disolvieron en un litro de agua destilada y se ajustó el pH de la solución a 9.0 con Na_2CO_3 , alcanzando una concentración de 35% y una densidad de 1.022-1.024 g/l. El agua así reconstituida después se aireó y removió mediante un sistema de aireación durante 24 horas, para conseguir las condiciones apropiadas de oxígeno y dióxido de carbono.

Preparación de la sustancia de ensayo

Las muestras procedieron de la planta de tratamiento de aguas residuales del proceso productivo de la Furvina en el CBQ, tomadas en dos puntos diferentes: en las aguas residuales sin tratamiento antes de ingresar a dicha planta (P1), y en la descarga de vertimiento de la planta (P2) a la alcantarilla de drenaje o efluente de dicha planta hacia la red de desagüe; se colectaron el mismo día del ensayo. Para ello, se tuvieron en consideración las técnicas de

muestreos de aguas establecidas. A las aguas finales para vertimiento se les determinaron diversos parámetros químico-físicos (temperatura, pH, sólidos sedimentables, conductividad eléctrica, sólidos totales disueltos, demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO₅), nitrógeno y fósforo totales), a temperatura de 20 °C y por triplicado, según los procedimientos descritos por la *American Public Health Association* (APHA-AWWA-WEF, 2012).

Estudio de toxicidad aguda

Se conformaron seis grupos para cada muestra de agua en estudio, utilizando concentraciones decrecientes de cada una de las muestras ensayadas (Tabla 1). Para ello se diluyó el agua problema en AMA, en proporción 1:10, en cinco diluciones sucesivas por cada muestra problema. Se tomaron 9.9 ml de cada dilución y se vertieron a placas de Petri. Se conformaron tres réplicas para cada concentración.

Tabla 1. Diseño de estudio de toxicidad de aguas residuales de la planta de producción del CBQ en larvas de *Artemia* sp.

Muestra	Réplica (núm. de larvas)	Diluciones ensayadas (%)
P1	10	100, 10, 1, 0.1,
	10	

	10	0.01
P2	10	100, 10, 1, 0.1, 0.01
	10	
	10	
Control	10	-
	10	
	10	

Un conjunto de 10 larvas de *Artemia* se introdujo en cada una de las placas, utilizando una micropipeta de volumen máximo de 100 μ l, realizando una confirmación posterior a su traslado, bajo lupa binocular, para asegurarse de que cada placa tuviera el número exacto de larvas y obtener un volumen de trabajo total de 10 ml. Se preparó un grupo control con 10 ml de AMA como patrón de comparación bajo similares condiciones de los grupos experimentales.

Las placas fueron incubadas a 25 °C en un local climatizado, en ambiente de oscuridad y durante 24 horas, sin alimentar los organismos. Posteriormente se hizo la lectura de cada placa bajo lupa binocular, contabilizando el número de larvas vivas y muertas en cada una de ellas. Se consideró que una larva estaba muerta cuando no exhibía ningún tipo de movimiento durante un periodo de observación de 10 segundos. Para la validez del ensayo, se consideró que los datos obtenidos en las placas controles fueran iguales o superaran 90% de supervivencia de larvas durante el experimento. Los resultados obtenidos fueron tabulados y procesados mediante análisis Probit en *SPSS® 19.0 software* (IBM® Corp., New York, EUA), obteniendo el valor de la CL_{50} con un intervalo de confianza de 95%.

Los resultados de mortalidad de los dos puntos de muestreo de aguas residuales se compararon mediante el ensayo paramétrico ANOVA de dos colas por compararse dos puntos de muestreos (factor 1) y cinco diluciones (factor 2). Este análisis se hizo con el paquete estadístico *STATISTICA10.0*.

Resultados y discusión

La Tabla 2 muestra los resultados de los parámetros químico-físicos determinados a la muestra de agua residual tratada en la planta de tratamiento de aguas residuales del CBQ.

Tabla 2. Composición químico-físico de las aguas residuales tratadas del proceso productivo de furvina.

Parámetros	Valor experimental	LMP NC 27: 2012*
Temperatura (°C)	32.53	< 50
pH	7.34	6-9
Sólidos sedimentables (ml/l)	0	< 10
Conductividad eléctrica, CE (µS/cm)	2342	< 4 000
Sólidos totales disueltos	1 171	

(mg/l)		
Demanda química de oxígeno (DQO) (mg/l)	243.38	< 700
Demanda biológica de oxígeno (DBO ₅) (mg/l)	94.69	
Nitrógeno total N _T (mg/l)	1	< 20
Fósforo total P _T (mg/l)	1.24	10
Materia flotante	No presente	No presente

LMP: límite máximo permisible.

*Oficina Nacional de Normalización (2012).

Como se observa, los resultados de todas las determinaciones cumplen con el límite máximo permisible (LMP) según la norma cubana NC 27: 2012 (Oficina Nacional de Normalización, 2012), lo que avala la efectividad del tratamiento utilizado.

Los resultados obtenidos después de la exposición de larvas de *Artemia* sp. a cada una de las muestras de aguas estudiadas en el tiempo de desarrollo larvario correspondiente a 24 horas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Comportamiento de la mortalidad de *Artemia* sp. en las dos muestras de aguas estudiadas.

Muestra	Dilución (%)	Mortalidad (%)	CL50 estimada	Valor de <i>p</i>
	100	100		

P1	10	100	CL ₅₀ < 0.01%	<i>p</i> < 0.001
	1	100		
	0.1	100		
	0.01	100		
P2	100	0	CL ₅₀ > 100%	
	10	0		
	1	0		
	0.1	0		
	0.01	0		
Control	-	0	-	

Al analizar los resultados, se observó que la muestra P1 fue sin duda la sustancia de ensayo más tóxica para las larvas, con diferencias altamente significativas para $p < 0.001$ respecto a la muestra P2 y control, donde no se evidenció mortalidad en los organismos en prueba. Los resultados obtenidos para la muestra P1, aguas sin tratar, resultan lógicos, pues se ha determinado que en la producción del 1-(5-bromo-fur-2-il)-2-bromo-2-nitroetano (furvina) se utilizan y generan varios compuestos y desechos tóxicos, causantes de severos impactos ambientales. Entre los compuestos agresivos al medio ambiente se encuentran:

- Furfural, clasificado como nocivo para organismos acuáticos y el que produce mezclas tóxicas con el agua (Acrós Organic, 2014; Merck, 2018b)
- Disulfuro de carbono, del que se reporta una CL₅₀ para Daphnia y peces en el orden de 2 mg/l (Agilent Technologies, 2018).

- Piridina y anhídrido acético, considerados como no peligrosos para medios acuáticos; pero de la primera se reporta toxicidad para dafnias y otros invertebrados acuáticos, en el orden de 3.5 mg/l (Merck, 2018c)
- Bromo, se orienta que sus descargas al ambiente deben evitarse por presentar un alto riesgo tóxico para el medio acuático, al reportarse EC50 en peces de > 10 mg/l (altamente tóxico) y EC100 para crustáceos de 10 mg/l (extremadamente tóxico) (Merck, 2018a; Merck, 2018d). - Etanol, se refiere la EC₀ para crustáceos (*Daphnia magna*) > 7 800 mg/l y se clasifica como tóxico, aunque en general se considera un compuesto no ecotóxico si la concentración del vertido no es muy elevada (GTM, 2018).

Además, dicho residual puede contener restos de los productos bioactivos, como furvina y productos auxiliares (detergentes e hidróxido de sodio). Es lógico considerar que esta mezcla, que incluso puede producir otros compuestos químicos por reacciones, degradaciones u otros procesos, debe presentar un riesgo elevado de ecotoxicidad al ser vertido de forma directa al sistema de desagüe de la entidad fabril que lo produce.

En las dos muestras no se pudieron estimar los valores de CL₅₀ debido a que en ambos casos los valores de mortalidad y no mortalidad fueron absolutos; es decir, en la muestra P1 se produjeron niveles de mortalidad total hasta una dilución de 0.01% y en la muestra P2 niveles nulos de dicha variable, inclusive en la muestra pura (100%). Dichos resultados no permitieron determinar las correspondientes relaciones concentraciones-efectos para cada muestra.

En el presente estudio, los resultados obtenidos para la muestra P1 en el efecto agudo sobre larvas de 24 horas permiten clasificarla como de clase I o muy tóxico, y para la muestra P2 se evidenció una toxicidad aguda no detectable a las concentraciones evaluadas y fuera de los valores de clasificación.

Resultados similares fueron obtenidos por Francisconi, De Bona, Da Silveira, Geremias y Pich (2013), al comparar la toxicidad de las aguas residuales de la industria minera del carbón con las obtenidas después de realizarle un proceso de descontaminación en larvas de *Artemia sp.*

Grinevicius *et al.* (2009) llevaron a cabo estudios donde evaluaron diferentes efluentes textiles y su posible relación con la inducción de biomarcadores de toxicidad agua en tres biomodelos, entre ellos *Artemia sp.*, donde compararon efluentes no remediados, efluentes remediados por kitosana pulverizada y por procesos convencionales de tratamientos de efluentes. En los últimos dos tratamientos, las muestras no mostraron toxicidad aguda en *Artemia*.

En el estudio realizado queda evidenciada la efectividad del método de tratamiento de los residuales del proceso de obtención de la furvina, medido mediante la toxicidad en un organismo acuático. Estas evaluaciones forman parte de una serie de experimentos que incluirán otras especies indicadoras acuáticas y terrestres, lo que permitirá determinar con más certeza el potencial ecotoxicológico de dichos residuales.

Conclusión

La evaluación ecotoxicológica mediante del empleo de la especie bioindicadora *Artemia* sp. demostró el proceso de detoxificación del tratamiento de los residuales de la Planta de Producción del Centro de Bioactivos Químicos.

Referencias

Acrós Organic. (18 de febrero, 2014). *Ficha de Datos de Seguridad. 2-Furaldehyde. Acrós Organic.* Recuperado de <http://www.fishersci.es>

Agilent Technologies. (30 de abril, 2018). *Calibration Sample, SimDist (D2887E), Part Number CP741035. Agilent Technologies.* Recuperado de https://www.agilent.com/cs/library/msds/CP741035_EUSpanish.pdf

APHA-AWWA-WEF, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed.* In: Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., & Clesceri, L. S. (eds.). Washington, DC, USA: USA American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation.

Artoxkit, M. (2003). *Artemia toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Mariakerke-Gent: Microbiotests.* Recuperado de <https://www.microbiotests.com/toxkits/ArtoxkitMstp.pdf>

- Dietrich G., & Kalle K. (1957). *Allgemeine Meereskunde. Eine Einführung in die Ozeanographie* (pp. 42-43). Berlin, Germany: Gebriider Barntreager.
- EPA, Environmental Protection Agency. (2002a). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*, 5th ed. (EPA 821/R-02/012). Recuperado de https://www.epa.gov/sites/...08/.../acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf
- EPA, Environmental Protection Agency. (2002b). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*, 4th (EPA 821/R-02-13). Recuperado de https://www.epa.gov/sites/...08/.../short-term-chronic-freshwater-wet-manual_2002.pd
- EPA, Environmental Protection Agency. (2004). *National whole effluent toxicity (WET) implementation guidance under the NPDES Program* (EPA 832-B-04-003). Recuperado de https://www3.epa.gov/npdes/pubs/wet_draft_guidance.pdf
- Francisconi, M. S., De Bona, A., Da Silveira, F. Z., Geremias, R., & Pich, C. T. (2013). Use of coal mining waste for river water treatment and evaluation of this process using physicochemical parameters and bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2), 45-51.
- Grinevicius, V. M., Geremias, R., Laus, R., Bettega, K. F., Laranjeiras, M. C., Fávere, V. T., Wilhelm, F. D., & Pedrosa, R. C. (2009). Textile effluents induce biomarkers of acute toxicity, oxidative stress, and genotoxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(2), 307-14.

- GTM. (30 de abril, 2018). *Etanol. Ficha de datos de seguridad. GTM. México. Revisión: enero de 2017 – Versión: 5*. Recuperado de www.gtm.net/images/industrial/e/ETANOL.pdf
- ICT, Institute of Chemical Technology. (2002). *Acute toxicity test on brine shrimp (Artemia spp). Laboratory work no. 6. Laboratory of Ecotoxicology and LCA. Department of Environmental Chemistry, Prague*. Recuperado de <https://www.yumpu.com/en/document/read/11545216/acute-toxicity-test-on-brine-shrimp-artemia-salina>.
- Manfra, L., Savorelli, F., Pisapia, M., Magaletti, E., & Cicero, A. M. (2012). Long-term lethal toxicity test with the crustacean *Artemia franciscana*. *Journal of Visualized Experiments*, (62), e3790.
- Martínez, M. B., Van der Bruggen, B., Negrin, Z. R., & Alconero, L. P. (2012). Separation of a high-value pharmaceutical compound from waste ethanol by nanofiltration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(5), 1635-1641.
- Merck. (30 de abril, 2018a). *Bromo. Ficha de datos de seguridad de acuerdo al reglamento CE. No. 1907/2006. Merck KGaA. EQ-RS*. Recuperado de <http://www.merck-chemicals.com>
- Merck. (30 de abril, 2018b). *Furfural. Ficha de datos de seguridad de acuerdo al reglamento CE. No. 1907/2006. Merck KGaA. LS-QHS*. Recuperado de <http://www.merck-chemicals.com>
- Merck. (30 de abril, 2018c). *Piridina. Ficha de datos de seguridad de acuerdo al reglamento CE. No. 1907/2006. Merck KGaA. LS-QHS*. Recuperado de <http://www.merck-chemicals.com>

Merck. (26 de mayo, 2018d). *1-bromo-3-cloropropano. Ficha de datos de seguridad según 1907/2006, Artículo 801627.* Recuperado de www.merckgroup.com

Oficina Nacional de Normalización. (2012). Norma Cubana NC 27: 2012 Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y el alcantarillado. Recuperado de scielo.sld.cu/pdf/riha/v37n2/riha09216.pdf

Pardo, M. (2012). *Implementación de Programas de Saneamiento Ambiental. Módulo didáctico.* Bogotá, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.

Pino-Pérez, O., & Jorge-Lazo, F. (2010). Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), 34-43. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000100008&lng=es&tlng=es

Suárez-Tamayo, S., & Molina-Esquivel, E. (2014). El desarrollo industrial y su impacto en el medio ambiente. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 357-363. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300008&lng=es&tlng=es