

Sulfato de Cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana *Osteopilus septentrinalis*.

**María Elisa Alea Reyes¹, Onelio Carballo Hondal², José Trujillo Hernández³,
María Antonia Torres Alemán.**

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Calle 222 y 27 La Coronela. La Lisa. Ciudad de La Habana Cuba. Teléfono 250-11-70. e-mail: mariaelisaalea@yahoo.com; mariatorres@infomed.sld.cu

² Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta ave y 248, Barlovento, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono 537-2097875.

³ Centro Nacional de Toxicología. Avenida 31 y 114. Marianao. Ciudad de La Habana. Cuba. e-mail: ecotox@infomed.sld.cu

Correspondencia a Onelio Carballo Hondal: onelio@cip.telemar.cu

Resumen

En la actualidad los ensayos de toxicidad aguda en laboratorios ecotoxicológicos requieren del uso de sustancias de referencia, con el fin de garantizar la calidad analítica de los mismos; entre éstas se encuentra el Sulfato de Cobre, del cual se tiene una amplia base de datos referente a su toxicidad en diversas especies de anuros en las que no está incluida la especie cubana *O.septentrionalis*.

El objetivo de este trabajo fue determinar el comportamiento del Sulfato de Cobre en larvas de rana de la especie *Osteopilus septentrionalis*, como un ensayo de referencia en la evaluación ecotoxicológica y así establecer datos preliminares para este tipo de ensayo y especies.

Para el estudio se desarrolló un sistema de ensayo estático de 96 horas de duración, siendo expuestas las larvas a las concentraciones de 0,4; 0,7; 1,0; 1,3; 1,7; 1,9 y 2,1 mg de Cu^{2+} /L en agua de solución.

Las variables analizadas fueron las siguientes: observación de mortalidad y determinación de la CL_{50} a las 96 horas de exposición.

Durante el tiempo de ensayo se pudo observar la presencia de mortalidad en los grupos tratados con sulfato de Cobre a las concentraciones de 0,7 mg Cu^{2+} /L siendo más severas a concentraciones superiores, donde a la concentración de 2,1 mg Cu^{2+} /L se produjo un 100% de mortalidad en 19 de los 20 grupos tratados.

Los valores de CL_{50} obtenidos a las 96 horas de exposición fueron de $0,910 \pm 0,126$ mg de Cu^{2+} /L, para larvas de rana *Osteopilus septentrionalis* en estadio 25 (E-25), con un coeficiente de variación (CV) de 13,8%, cumpliendo así el Sulfato Cúprico con los criterios establecidos para ser utilizado como sustancia de referencia en ensayos ecotoxicológicos en larvas de rana de la especie *Osteopilus septentrionalis*.

Palabras clave: *Osteopilus septentrionalis*, Sulfato de Cobre, Sustancia de Referencia, Toxicidad Aguda.

Abstract

Copper sulfate as reference substance in toxicity test in larvae Cuban frog *Osteopilus septentrionalis*.

At presente, the acute toxicity tests in ecotoxicological laboratorios requiere the use of reference substances, in order to insure the analytical quality of them, among these is the copper sulphate, which has an extensive database concerning its toxicity to several species of frogs, where the cuban *Osteopilus septentrionalis sp.* was not included.

The aim of this study was to determine the behaviour of sulphate of copper in larvae of the frog, *O. septentrionalis*, as a test of reference for the ecotoxicological evaluation, and therefore, to establish preliminary data for this type of test and species.

For this study, a system of static test of 96 hours was developed, where larvae were exposed at concentrations of 0.4; 0.7; 1.0; 1.3; 1.7; 1.9 and 2.1 mg of Cu²⁺/L in solution water.

The analyzed variables were as follows: observation of mortality and determination of LC₅₀ at 96 hours of exposure.

During the time of assay was observed the presence of mortality in the treated groups with copper sulphate at concentration of 0.7 mg of Cu²⁺/L, being more severe at higher concentrations, where at concentration of 2.1 mg of Cu²⁺/L was produced a 100% of mortality in 19 of the 20 treated groups.

LC₅₀ values obtained at 96 hours of exposure were 0.910±0.126 mgCu²⁺/L, for larvae of *O. septentrionalis* in stage 25, with a coefficient of variation (CV) of 13.8%, so that, copper sulphate fulfil with established criteria to be used as a reference substance in ecotoxicological assays in larvae of frog, *Osteopilus septentrionalis*.

Key words: *Osteopilus septentrionalis*, Copper sulphate, Reference substance, Acute toxicity.

Introducción

En la actualidad, en los bioensayos ecotoxicológicos se ha hecho énfasis en la utilización de sustancias de referencia, para validar las condiciones de salud y sensibilidad de los organismos de ensayo, sean ellos procedentes del campo o criados en el laboratorio. Además, dichas sustancias son utilizadas para definir las condiciones esenciales de ensayos para cada especie, y en este caso, ampliar el conocimiento en cuanto al comportamiento de las larvas de rana de la especie *Osteopilus septentrionalis* (rana platanera) ante sustancias de referencia, lo que permite la validación de los estudios ecotoxicológicos donde se utilice esta especie y de la cual no se han reportado resultados de su exposición a estas sustancias. La base de datos sobre la toxicidad del cobre es muy amplia, refiriéndose en su totalidad a especies de anuros en las que no está incluida la *O. septentrionalis*, especie cubana empleada como uno de los organismos acuáticos para evaluar toxicidad en este ecosistema.

El Sulfato cúprico es el compuesto de cobre de mayor importancia industrial empleándose como abono y pesticida en la agricultura, alguicida en la depuración del agua y como conservante de la madera. Se presenta en forma de cristales, gránulos o polvos de color azul, inodoro pero con sabor metálico, su densidad relativa es de 2,286 a 15,6 °C, peso molecular de 15,6 , presenta alta solubilidad en agua y resulta prácticamente insoluble en solventes orgánicos.¹

Existen diversas sustancias de referencia como la Cloro acetamida, Cloruro de potasio, Cloruro de cadmio, Sulfato de zinc, Nitrato de plata, Sulfato de cobre entre otras. En este trabajo se escogió el Sulfato cúprico por cumplir con la mayoría de los criterios establecidos para su selección como son: ser un contaminante ambiental, tener información previa sobre su toxicidad, solubilidad, estabilidad y métodos analíticos, fácil de analizar químicamente, disponibilidad en el mercado con pureza consistente, solubilidad y estabilidad en agua y disponer de datos ecotoxicológicos básicos.²

El objetivo de este estudio fue determinar el comportamiento del Sulfato de cobre como sustancia de referencia en ensayos ecotoxicológicos, sobre larvas de rana de la especie *Osteopilus septentrionalis* en E-25.

Materiales y Métodos

En este estudio se empleó como sustancia de ensayo el Sulfato de Cobre(sustancia de referencia) y larvas de rana de la especie *Osteopilus septentrionalis* como organismo de ensayo, dicha especie fue escogida por cumplir con los siguientes criterios de selección: abundante representatividad ecológica, ser miembro de la cadena trófica relacionada directa o indirectamente con el hombre, disponibilidad y adecuabilidad para pruebas de laboratorio y existencia de gran variedad de datos sobre su biología y ecología.^{3,4,5}

Los huevos de *O.septentrionalis* se colectaron de su ambiente natural en estanques plásticos, entre vegetación espesa, simulando las condiciones de hábitat de la especie. Fueron adaptados a las condiciones de laboratorio y luego de eclosionados, las larvas fueron seleccionadas para los experimentos.⁵

Las larvas utilizadas para las pruebas fueron sanas, sin malformaciones en su cuerpo, encontrándose en el estadio 25 según clasificación de Gosner 1960,⁶ con peso corporal entre 0,008-0,020 g, considerándose el criterio de que al existir diferencias entre las tallas, las mayores no deberán ser el doble de las más pequeñas.

Las condiciones ambientales para el período de adaptación y del ensayo coinciden manteniendo los siguientes parámetros: Iluminación: fotoperíodo de 12 horas X 12 horas, Temperatura: 23-25°C, pH de la solución: 6,5-8,5, dureza del agua: 10-300 mg CaCO₃/L.

Diseño experimental

El ensayo se desarrolló en un sistema estático para la determinación de la toxicidad provocada por el Sulfato de Cobre sobre larvas de rana *Osteopilus septentrionalis* en (E-25).

La prueba se llevó a efecto siguiendo las guías ASTM Y ANFITOX⁷, cumpliendo con las regulaciones de las buenas prácticas de laboratorio para este ensayo.⁷

La duración del estudio fue de 96 horas y la ruta de exposición de las sustancias de ensayo fue directamente en el agua de dilución, mezclándose y dejando reposar una hora, para lograr uniformidad y homogeneidad en la solución.

Transcurrido el tiempo fijado, las larvas son introducidas en los recipientes de ensayo, cuidando de que no se dañen y sufran el menor estrés posible.

Se utilizaron 20 grupos de ensayo, donde las larvas fueron distribuidas aleatoriamente, 20 por grupos a razón de 10 larvas en cada réplica, en frascos de 400ml de solución. Las concentraciones de ensayo fueron de 0,4; 0,7; 1,0; 1,3; 1,9 y 2,1 mgCu²⁺/L para el control negativo y los grupos tratados con Sulfato de Cobre.

Las observaciones se realizaron durante las 96 horas que duró el ensayo, donde los criterios para definir ocurrencia de mortalidad fueron: pérdida de movimiento y falta de reacción al contacto suave; para mayor seguridad pueden observarse las larvas en el estereoscopio.

Para la determinación de la CL₅₀ se utilizó el programa Probit de la EPA y el Dunett para la significación estadística.^{8,9}

Resultados y Discusión

Durante el ensayo, los resultados obtenidos en las 20 pruebas de toxicidad aguda a las 96 horas utilizando Sulfato de Cobre como sustancia de referencia, se reflejan en la tabla 1 donde la aparición de las primeras larvas muertas se observaron a la concentración de 0,7 mg de Cu Cu²⁺/L, observándose un aumento en el porcentaje de mortalidad a medida que las concentraciones de exposición fueron superiores, resultando ser más severas a concentraciones de 2,1 mg de Cu²⁺/L, con un 100% de mortalidad en la mayoría de los grupos tratados. (Ver Tabla 1)

En la tabla 1 se describen además los valores medios de CL₅₀ para cada prueba de toxicidad correspondiendo a una prueba por mes, durante 20 meses. El valor mínimo obtenido de CL₅₀ fue 0,804 mg/L y el valor máximo fue 1,125 mg/L, la media de la CL₅₀ de los 20 ensayos fue 0,91 mg/L, el cual se encuentra dentro de los rangos reportados por la literatura^{2,10,11,12} en otras especies, valores como CL₅₀ de 0,105 mg/L para embriones de *Bufo arenarum*¹⁰, el valor de CL₅₀ encontrado en nuestros ensayos se clasifica muy tóxica, el cual es uno de los criterios de selección de una sustancia de referencia, cumpliendo los demás criterios de selección.

El coeficiente de variación obtenido fue de 13,8 %, considerándose como muy bueno y preciso teniendo en cuenta lo reportado por la literatura que plantea de forma general que un método ecotoxicológico es considerado bueno cuando el $CV \leq 30\%$.²

Al comparar los resultados obtenidos en nuestros ensayos para el sulfato de cobre de CV 13,8 %, con resultados reportados en estudios de precisión analítica de ensayos ecotoxicológicos realizados en Brasil en diferentes especies acuáticas como *Danio rerio*, *Daphnia similis*, *Hyaella azteca* con valores de CV de 17,8 %, 21,7 % y 24,2 % respectivamente, observamos un valor inferior a los reportados.¹²

Esta diferencia puede deberse a un sin número de factores como son, los diferentes hábitat, las condiciones de ensayo, soluciones utilizadas, propiedades del agua como dureza, conductividad, características propias de cada especie que propicien las diferentes respuestas ante la exposición de un determinado producto químico y/o biológico, la alimentación de los animales, aclimatación y factores ambientales, entre otros.

Los datos de CL_{50} resultado de 20 ensayos (tabla 1), se realizaron con una frecuencia entre ellos no menor de treinta días, correspondiendo con los criterios aceptados y recomendados de intervalos de tiempo apropiado, que deben ser establecidos en una base de datos para organismos cultivados en el laboratorio. Para la determinación de estos valores se empleó, el ensayo de evaluación de toxicidad aguda de 96 horas, observándose variabilidad en los valores con respecto a la media, y con una tendencia aceptable sin desviaciones dentro de los límites establecidos de $\pm 2DS$. De esto se derivó una carta control para la sustancia de referencia utilizada en nuestro caso, el Sulfato de Cobre (Figura 1).

Estos resultados ofrecen criterios primarios de precisión, exactitud y de referencia en ensayos ecotoxicológicos en larvas de rana en nuestro país, teniendo como criterio que la reproducibilidad ofrece un mejor estimado de errores aleatorios, pues al prolongarse el período de estudio, se ofrece una oportunidad mayor de que ocurran estos errores, que son fuente de variación analítica e inciden en los resultados de sensibilidad de los organismos en los ensayos ecotoxicológicos.

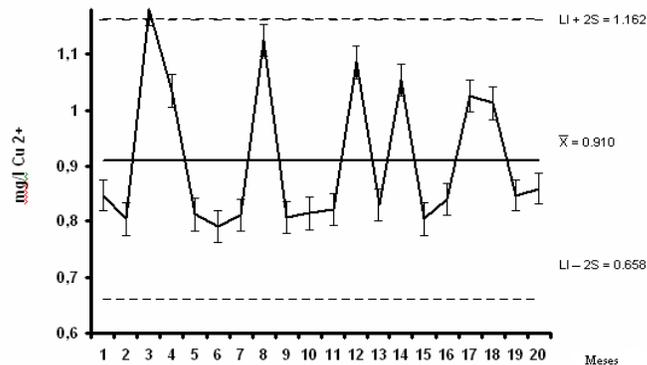
Conclusiones

El sulfato de cobre, cumplió con los criterios establecido para ser utilizado como sustancia de referencia en el control de calidad de ensayos ecotoxicológicos en larvas de ranas *O. septentrionalis* con un Coeficiente de Variación de 13,8%

Tabla 1. Por ciento de mortalidad en larvas de rana *Oseptentrionalis* a las 96 horas de expuestas al Cu²⁺

Grupos	Concentraciones (mg/L)							
	Control	0,4	0,7	1,0	1,03	1,9	2,1	CL ₅₀
1	0	0	40	65	85	95	100	0,847
2	0	0	45	65	85	95	100	0,804
3	0	0	10	25	65	85	95	1,180
4	0	0	10	45	85	90	100	1,035
5	0	0	40	75	85	100	100	0,812
6	0	0	0	50	60	95	100	0,791
7	0	0	45	70	85	100	100	0,811
8	0	0	45	75	80	95	100	1,125
9	0	0	40	70	90	95	100	0,807
10	0	0	15	35	60	100	100	0,814
11	0	0	45	70	90	95	100	0,821
12	0	0	40	65	85	95	100	1,086
13	0	0	40	60	85	95	100	0,829
14	0	0	35	70	90	95	100	1,054
15	0	0	15	35	80	100	100	0,084
16	0	0	45	70	90	95	100	0,834
17	0	0	45	70	90	95	100	1,026
18	0	0	25	50	55	100	100	1,013
19	0	0	10	25	65	85	95	0,847
20	0	0	45	75	90	95	100	0,860

Figura 1. Concentración Letal Media (CL₅₀) del Cu²⁺ a las 96 horas.



Referencias Bibliográficas

1. Sulfato Cúprico-Wikipedia, la enciclopedia libre.es. wikipedia.org/wiki/sulfato-cúprico-34k.
2. Zagatto. Pedro. A, Bertoletti. E. Sustancias de referencias no controle de Qualidade de Ensaio Ecotoxicológicos. En: Ecotoxicología Acuática, Principios e applicacoes. Ed. Rima, Sao Carlos, Brasil; 2005.8:478-486.
3. Alvarez Perez. EJ. MSc.et.al, (2006) -Tesis presentada en opción al grado científico de: aestro en ciencias. Evaluación ecotoxicológica del Biofungicida Gluticid en madio acuático. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Centro Nacional de Toxicología.
4. Carballo Hondal, O. MSc. et. al, (2003) -Tesis presentada en opción al grado científico de: Maestro en ciencias. Estudios ecotoxocológicos del Bionematicida Hebernem. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Centro Nacional de Toxicología.
5. Environmental protection Agency. Methods for acute toxicity test fish, macroinvertebrate, and amphibians . Ecol Res ser. EPA -660/3-75009/S1/: EPA;1975.
6. Gosner KL. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification. Herpetology 16:183-190
7. Herkovits. J, Pérez. Coll. C. Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio (ANFITOX). basado en Bufo arenarum. Test agudo (ANFIAGU). Crónico corto (ANFICOR). Crónico (ANFICRO) Y de Estadíos Tempranos del Desarrollo (ANFIEMB). Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS);1995.42:24-30;43:50-55
8. Environmental Protection Agency. Dunett. Programa versión 1.5 Ecological Monitoring Research /s.l/;EPA1989.
9. Knie J; A; Juhnke I, Schiller W. Results of Studies on Chemical Substances with Four Biotests. Dtsch. Gewaesserkd. Mitt. 1983 27(3);77-9.
10. Herkovits, J; Helguero, LA. 1998. Sci. Total. Environ.221(1):1-10. Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibian embryos.
11. Scelso. Marcelo A,1997. Invest. Mar. Valparaiso, 25:177-185. Toxicidad del cobre en larvas de nauplii del camarón comercial Artemisa longiraris Bate (Crustácea, Decapoda, penaeidae).
12. De Schampelaere, K.A.C.et al. 2007 Aquatic Toxicology, 81:409-418.

Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*.

Recibida: 10/07/09

Aceptada: 29/10/09