

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Ozonización (O₃) en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*

Álvarez, M¹., Perdomo, L., Navarro E., Arias, M., Benítez, JM., Mikuski, J.

¹. Sección de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo" de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela, 01053.

Resumen

El ozono (O_3), es una sustancia altamente reactiva que ha sido utilizada a nivel industrial como un desinfectante y depurador de aguas minerales. Recientemente, se ha incrementado su aplicación en tratamientos de agentes patógenos. Sin embargo, pocos son los reportes científicos referidos a las directrices sobre los tiempos de exposición y las concentraciones aplicadas. El objetivo de la investigación fue caracterizar un modelo experimental capaz de mostrar la eficacia del proceso de ozonización y que además permita visualizar los daños inducidos a cortos y largos tiempos de exposición, tomando en cuenta la alta toxicidad que posee esta sustancia. Para ello, una población larvaria de pez cebra *Danio rerio* de 5dpf, fue sometida de forma aguda en un ambiente de O_3 de una concentración de 0,05 ppm, que fue generada por un equipo OxigenYPlus Desinfectador. Las respuestas tóxicas fueron registradas a los 5, 8, 10, 15 y 20 minutos de exposición. A tiempos cortos de exposición, definidos entre 5 y 8 minutos, no hubo registro de señales tóxicas aparentes. Sin embargo, a partir de los 10 minutos, se detectaron efectos tóxicos significativos como la torsión de la cola de las larvas en el 20% de la población que aumentó a un 60% a los 15 minutos. A partir de los 15 minutos incrementaron los daños; con la aparición de la torsión troncal en un 80% de la población larvaria así como la pérdida de la actividad cardíaca en un 100% de la misma a los 20 minutos de exposición. Los resultados corroboran la acción tóxica del O_3 como un proceso dependiente del tiempo de exposición así como de la concentración. Son estos parámetros de consideración al momento de asumir cualquiera de las distintas aplicaciones de esta sustancia.

Palabras Claves: Ozono (O_3), toxicidad, pez cebra *Danio rerio*.

Summary

Ozonation (O_3) in zebrafish *Danio rerio* larval model.

Ozone (O_3) is a highly reactive substance that has been used industrially as a disinfectant and cleanser of mineral waters. Recently, the number of its applications in pathogen treatment has increased. However, there are few scientific reports concerning the guidelines on exposure times and concentrations applied. The aim of the investigation was to characterize an experimental model of ozonation efficiency regarding the damage induction on both, short and long exposure times, taking into account the substance's high toxicity. To this effect, a population larval zebrafish *Danio rerio* of 5dpf was acutely subjected to an O_3 atmosphere of 0.05 ppm, generated by OxigenYPlusDisinfectador equipment. Toxic responses were recorded at 5, 8, 10, 15 and 20 minutes of exposure. At short exposure times, defined as periods between 5 and 8 minutes, there were no

apparent signs of toxic log. However, from this point forward, significant toxic effects, as the twisting of the larvae's tails, were detected particularly by 20% at 10 minutes and 60% after 15 minutes. After 15 minutes, damage was increased, with the appearance of trunk torsion on 80% of the larval populations as well as the loss of cardiac activity on 100% of the larval population at 20 minutes. The results confirm the toxic action of O₃ being dependent on the exposure time and concentration. Therefore, these are parameters to take into account when considering the various applications of this important substance.

Keywords: Ozone (O₃), toxicity, Zebrafish *Danio rerio*.

Introducción

El ozono (O_3) es una sustancia cuya molécula está compuesta por tres átomos de oxígeno, formada al disociarse los dos átomos que componen el gas de oxígeno. Cada átomo de oxígeno liberado se une a otra molécula de oxígeno gaseoso (O_2), formando moléculas de O_3 ¹. El O_3 se puede producir artificialmente mediante un generador de ozono para ser utilizado a nivel industrial como precursor en la síntesis de algunos compuestos orgánicos, pero principalmente como desinfectante depurador y purificador de aguas minerales². Su principal propiedad es la de ser un fuerte oxidante, detectable a concentraciones por debajo de 0,1 ppm. Es bastante soluble, por lo que su acción irritante se manifiesta en las vías respiratorias superiores³. Aunque no es probable que el O_3 de forma natural aparezca en concentraciones peligrosas para el hombre, es un compuesto extremadamente reactivo⁴. En los últimos años, además de su comprobada eficacia como agente desinfectante del agua, ha repuntado el uso del O_3 como descontaminante ecológico, sobre todo por parte de las industrias generadoras de alimentos agrícolas para la eliminación de agentes patógenos en los alimentos producidos⁵. Sin embargo, pocos han sido los reportes referidos a las directrices sobre los tiempos de exposición y la generación de efectos tóxicos a corto y largo plazo. Esta situación ha incentivado la búsqueda de modelos experimentales que permitan establecer la eficacia del proceso de ozonización en cuanto a la inducción de daños debido a la alta toxicidad que posee esta sustancia. Es por ello que la presente investigación se ha propuesto realizar un bioensayo en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio* que permita estimar el nivel de toxicidad del O_3 en cuanto a concentración y tiempo de exposición.

Materiales y Métodos

Bioensayo de toxicidad con O_3

El bioensayo consistió en someter a organismos vivos, como el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, a un ambiente de O_3 a una concentración de 0,05 ppm suministrada por un equipo Oxigen Y Plus Desinfectador, de una potencia de 18W y una producción de 500mg/h. Para ello, se realizó una recolección de 60 larvas de 5 días post-fertilización, se colocaron en una cápsula de Petri con un nivel mínimo de agua de pecera. Esta cápsula fue introducida en la bolsa de polietileno, 8x12 cm, con un punto de entrada a la manguera dispensadora de O_3 proveniente del equipo (Fig.1). Seguidamente, se hizo pasar O_3 , durante un minuto, hasta alcanzar la máxima capacidad de la bolsa. Seguidamente, se retiró la manguera y la bolsa fue completamente sellada. A partir de allí se realizaron las observaciones a través del microscopio Olympus IX71, haciendo

registros fotográficos a tiempos cortos de 5 y 8 minutos y tiempos mayores de 10, 15 y 20 minutos de exposición.

Resultados

Los resultados no mostraron señales de toxicidad a tiempos cortos de 5 y 8 minutos de exposición a la atmosfera de 0,05 ppm O₃. Sin embargo, a partir de este tiempo se detectaron efectos tóxicos significativos como la torsión de la cola de las larvas, particularmente en un 20% a los 10 minutos y un 60% a los 15 minutos. A partir de los 15 minutos se incrementaron los daños; con la aparición de la torsión troncal en un 80% de la población larvaria así como la pérdida de la actividad cardíaca en un 100% de la misma, a los 20 minutos de exposición (Fig.2).

Discusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación demostraron que la aplicación de una concentración de O₃ de 0,05 ppm, sobre la población larvaria de pez cebra *Danio rerio*, actúa biológicamente sobre el modelo larvario induciendo señales de toxicidad dependientes del tiempo de exposición. La exposición aguda de O₃ en tiempos cortos, particularmente entre los primeros 5 y 8 minutos, no promovió señales aparente de afección alguna en la población larvaria estudiada. Sin embargo, a partir de los 10 minutos en adelante las señales de toxicidad fueron evidentes y significativas. Los resultados obtenidos guardan similitud con los resultados obtenidos por otros autores, quienes haciendo uso de una concentración de 0,06 ppm de O₃ demuestran efectos biológicos significativos luego de la exposición durante 6 horas⁶. Así, cabe destacar que la eficiencia o no del uso O₃ en tiempos controlados de exposición, se debate por tanto entre valores máximos y mínimos de concentración de O₃, de lo cual dependerá la aparición o no de efectos tóxicos a corto y largo plazo, en adultos y neonatos⁷. En tal sentido, cabe destacar que la concentración de 0,1 ppm ha sido definida en algunos casos como el límite recomendado de exposición de O₃ en un tiempo de ocho horas, mientras que la concentración de 0,03 ppm, ha sido considerada como el límite recomendado de presión de O₃ para un periodo de 15 minutos⁸. Efectivamente al comparar una concentración de O₃ de 0,05 ppm, ubicada en el 38,46% de la concentración media considerada por otros autores, resultaría evidente que una concentración por encima de misma tendría que ser aplicada a un menor tiempo. Por tanto, en el caso de los 0,05 ppm su tiempo de aplicación para evitar acción toxica estaría por debajo de las 10 horas y por encima de este tiempo podría ser utilizada en un posible proceso de desinfección de microorganismos. En tal caso resultaría necesario profundizar sobre cuestiones como el tiempo de exposición así como de las directrices, a corto y mediano plazo, referidas a las

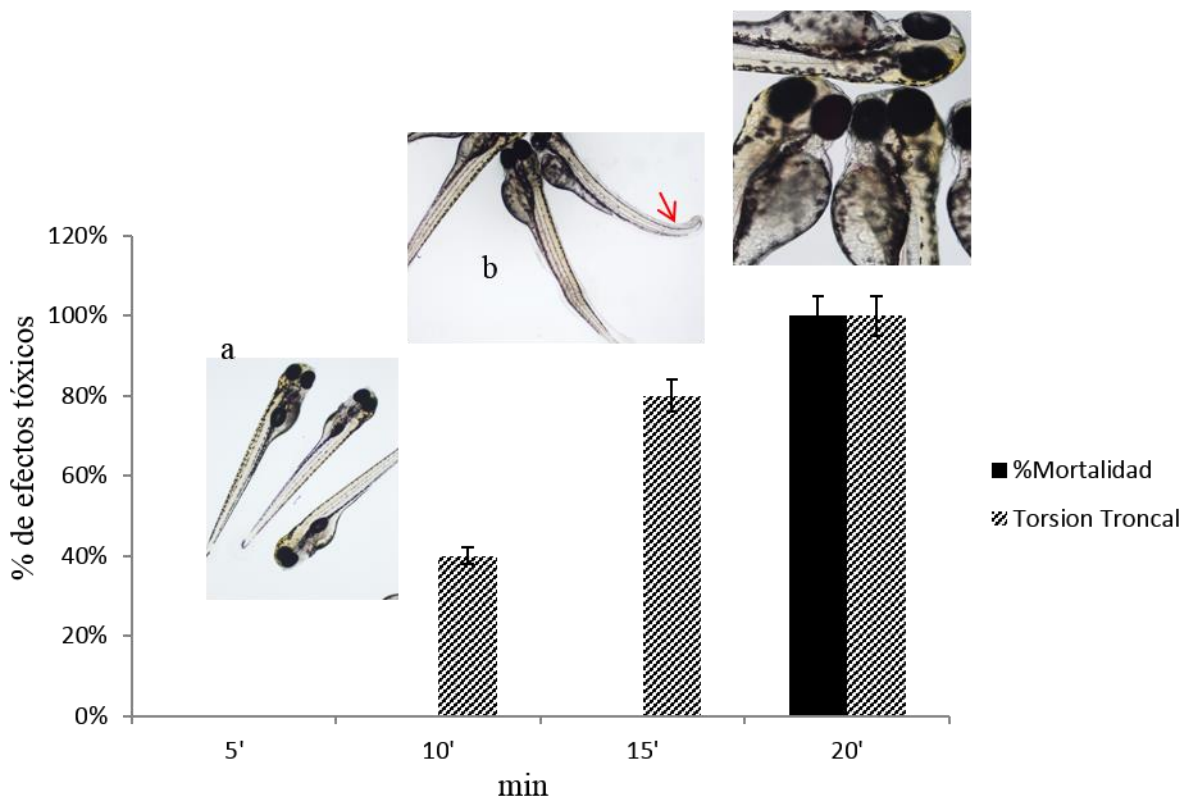
respectivas concentraciones, lo cual incluiría las evaluaciones concentración-respuesta, ya que los diversos efectos tóxicos sobre los organismos dependerán de la concentración de O₃ aplicada. Por otra parte cabe destacar que incluso en concentraciones muy bajas el O₃ este puede ser nocivo para el tracto respiratorio superior y los pulmones, aun tratándose de una exposición de corta duración⁹. A concentraciones mayores, el ozono puede producir hipersensibilidad bronquial y respuesta inflamatoria en el tejido respiratorio¹⁰. Además la exposición intermitente puede producir una inflamación en bronquios y pulmones así como también puede provocar edema pulmonar el cual puede aparecer hasta veinticuatro horas más tarde de la exposición. El O₃ reacciona con proteínas y lípidos, particularmente con membranas biológicas¹¹. Una pequeña cantidad se absorbe en la sangre; su reactividad extrema limita su habilidad de acumularse. Es posible que haya efectos secundarios caracterizados por un defecto en la disociación del oxígeno de la oxihemoglobina. Incluso en niveles de exposición de O₃ de 0.1 ppm, puede resultar en un envejecimiento prematuro si la exposición es lo suficientemente prolongada^{12, 13}. De manera que en el campo de la aplicabilidad de desinfección contra microorganismos patógenos sería recomendable la aplicación de altas concentraciones en cortos tiempos de exposición.

Fig.1. La figura representa el diseño de experimental para la ozonización *in vivo* sobre modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*. a) Fuente de ozonización, OxigenYPlus Desinfector. Capsula de Petri con población larvaria de Pez cebra (2). Bolsa de polietileno 8x12 cm (3). Manguera dispensadora (4). A mayor aumento (a'), se destaca la capsula contentiva de las larvas en el ambiente ozonizado. Por último, observación al microscopio Olympus TX71 invertido, para registro fotográfico y observación morfológica.



Fig.2. La imagen resume los resultados de someter a una población (N=60) de larvas de pez cebra *Danio rerio* de 5dpf a una atmosfera de O₃ de concentración 0,05 ppm, proveniente de un dispensador de ozono, durante diferentes periodos de tiempo de exposición. Entre los 5 y 8 min, no se detectaron señales de toxicidad (a). Estas se hacen evidentes y significativas entre los 10 y 15 min y se tipificaron a través de la torsión de cola (b-flecha) y finalmente inhibición de la actividad cardiaca, alcanzando la mortalidad a los 20 min (barra negra).

Ozonización en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*



Bibliografía

1. Rubin, Mordecai B. the History of Ozone. The Schönbein Period, 1839–1868. *Bull. Hist. Chem.* (2001); **26** (1): 40-56.
2. Towards reducing DBP formation potential of drinking water by favoring direct ozone over hydroxyl radical reactions during ozonation.
3. Similar articles4 MUDWAY, I. S. & KELLY, F.J. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Molecular aspects of medicine*, 21: 1–48 (2000).
4. Calderon-Guzman, D., Hernández-Islas, JL., Castilla-Serna, E., Hernández-García, A., Barragan-Mejias, G., Rodriguez-Perez, G., Villegas-Osnaya, G. El ozono como molécula reactiva. *Concepto actual*. 2000; Vol. 14: 115-123.
5. Cho K, Shibato J, Kubo A, Kohno Y, Satoh K, Kikuchi S, Sarkar A, Agrawal GK, Rakwal R. Comparative analysis of seed transcriptómica of ambient ozone-fumigated 2 different rice cultivars. *Plant Signal Behav.* 2013 Nov; 8(11): 1-11.
6. Brown, J S., Bateson, T F., McDonnell, W F. F. Effects of Exposure to 0.06 ppm Ozone on FEV1 in Humans: A Secondary Analysis of Existing Data. *Environmental Health Perspectives* 2008; Vol. 116 (8):1023-1026
7. Raub, J A. Effects of low level ozone exposure on pulmonary function in adult and neonatal rats. *Environmental toxicology*. 1983; Vol. 5: 363–367.
8. http://aesat.com/ion-spa/Toxicidad_del_ozono.pdf. Consultado el 24 d junio 2016.
9. Ljolinsbee, LJ. Pulmonary function and symptom responses after 6.6 hour exposure to 0.12 ppm ozone with moderate exercise. *Journal of the air pollution control association*. 1988; Vol. 38: 28–35
10. Frank, R. Repetitive ozone exposure of young adults. Evidence of persistent small airway dysfunction. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001; Vol. 164:1257–1260
11. Broeckaert, F. Serum clear cell protein: A sensitive biomarker of increased lung epithelium permeability caused by ambient ozone. *Environmental health perspectives*. 2000; Vol. 108: 533–537.
12. McDonnell, W.F. Long-term ambient ozone concentration and the incidence of asthma in nonsmoking adults: the ashmog study. *Environmental Research*. 1999; Vol. 80: 110–121.
13. Aرسالane, K. Increased serum and urinary concentrations of lung clear cell protein in rats acutely exposed to ozone. *Toxicology and applied pharmacology*. 1999; Vol. 159:169–174.

Recibido: 29/06/16

Aceptado: 06/07/16