

TRABAJO FINAL
CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN
APLICACIONES TECNOLÓGICAS DE LA
ENERGÍA NUCLEAR

**Evaluación de los efectos del uso de
radiaciones ionizantes sobre contaminantes
ambientales.
CEATEN**

Bioq. Jerónimo Héctor Leberle

Director
Lic. Magalí Dalto

Co-Director
Bioq. José Pachado

Comisión Nacional de Energía Atómica
Universidad Nacional de Cuyo – Instituto Balseiro
Universidad de Buenos Aires – Facultad de Ingeniería

Diciembre 2019

Inventario 24625
19/09/2022
Biblioteca Leo Falicov

Agradecimientos

A mi familia, por el apoyo y afecto incondicional no sólo en esta etapa sino durante toda la vida.

A mis amigos de toda mi vida, que a pesar de la distancia estuvieron cerca.

A mis nuevas amistades, por acompañarme durante todo el trayecto de la especialidad.

A Magalí y José, por todos los consejos, enseñanzas y sobretodo la paciencia durante el desarrollo de este proyecto desde el primer día.

A Cintia y Myriam, por su calidez y estar siempre atentas, brindándome una gran ayuda durante estos meses.

A la Educación Pública, la cual me hizo crecer no sólo como profesional, sino también como persona.

Resumen

Los efluentes de aguas residuales municipales son la fuente más importante de contaminantes emergentes en el medio ambiente acuático. Las plantas tradicionales de tratamiento de aguas residuales, incluso las más avanzadas, no son lo suficientemente eficientes como para eliminarlos por completo. Estos compuestos generan un riesgo ambiental que pueden afectar la vida acuática y a la salud humana.

El objetivo general fue determinar los efectos de la radiación gamma sobre determinados compuestos tóxicos. Además, aplicar ensayos de toxicidad para evaluar si la respuesta tóxica del compuesto fue modificada frente al uso de la radiación gamma.

Se preparó una solución de ciprofloxacina a una concentración de 5mg/L. Dicha solución se irradió a 1,5kGy y para la concentración de 100mg/L se irradiaron desde los 3kGy hasta los 12kGy. Para ninguna concentración los resultados obtenidos fueron favorables, tanto los ensayos con el espectrofotómetro al igual que los ensayos de toxicidad indicaron la generación de nuevas moléculas luego de la irradiación que fueron más tóxicas que el contaminante original.

Se preparó una solución de cristal violeta a una concentración de 2,5mg/L. Esta misma solución fue irradiada a diferentes dosis de 300Gy, 500Gy, 800Gy, 1000Gy 1500Gy y 2000Gy, se realizaron ensayos de espectrofotometría, ensayos de calidad de agua y ensayos de toxicidad utilizando diferentes modelos biológicos como *Daphnia magna*, *Chlorella vulgaris* y *Lactuca sativa*. En base a los resultados obtenidos se observó que a medida que aumentó la dosis, la coloración característica desapareció, en tanto los ensayos de toxicidad crónica y agudos arrojaron resultados variables dependiendo de la sensibilidad del modelo biológico utilizado. Sin embargo la radiación gamma resultó ser un tratamiento prometedor para ciertos compuestos emergentes y para otros, aunque a ciertas dosis se generen moléculas más tóxicas. Una alternativa puede ser utilizar un tratamiento combinado con los convencionales. Para ello se necesitará de futuras investigaciones para comprobarlo.

Abstract

Municipal wastewater effluents are the most important source of emerging pollutants in the aquatic environment. Traditional wastewater treatment plants, even the most advanced ones, are not efficient enough to completely eliminate them. These compounds involve an environmental risk that can affect aquatic life and human health.

The general aim of this project was to determine the effects of gamma radiation on certain toxic compounds. In addition, apply toxicity tests to assess whether the toxic response of the compound was modified against the use of gamma radiation.

A solution of ciprofloxacin was prepared at a concentration of 5mg/L. This solution was irradiated at 1,5kGy and for the concentration of 100mg/L, they were irradiated from 3kGy to 12kGy. For no concentration the results obtained were favorable, both the spectrophotometer tests and the toxicity tests indicated the generation of new molecules after irradiation that were more toxic than the original contaminant.

A crystal violet solution was prepared at a concentration of 2,5mg/L. It was irradiated at different doses of 300Gy, 500Gy, 800Gy, 1000Gy 1500Gy and 2000Gy, spectrophotometry tests, water quality tests and toxicity tests were performed using different biological models such as *Daphnia magna*, *Chlorella vulgaris* and *Lactuca sativa*. Based on the results obtained, it was observed that as the dose increased, the characteristic coloration disappeared, while chronic and acute toxicity tests yielded variable results depending on the sensitivity of the biological model used. However, gamma radiation proved to be a promising treatment for certain emerging contaminants and for others, although at certain doses more toxic molecules are generated. An alternative may be to use a treatment combined with conventional ones. This will require future research to verify.

Introducción y objetivo general

Los efluentes de aguas residuales municipales son la fuente más importante de contaminantes emergentes en el medio ambiente acuático. Las plantas tradicionales de tratamiento de aguas residuales, incluso las más avanzadas, no son lo suficientemente eficientes como para eliminar por completo estos contaminantes. Por otro lado, es importante que los desechos de los productos farmacéuticos, de los productos para el cuidado personal y los disruptores endócrinos no estén presentes en el medio ambiente debido a su capacidad para inducir efectos fisiológicos en humanos y en la vida silvestre. Estos compuestos generan un riesgo ambiental que pueden afectar la vida acuática y a la salud humana.

El objetivo general fue determinar los efectos de la radiación gamma sobre determinados compuestos tóxicos. Aplicar ensayos de toxicidad para evaluar si la respuesta tóxica del compuesto fue modificada frente al uso de las radiaciones gamma. Buscar consolidar el uso de las radiaciones ionizantes como una tecnología amigable con el medio ambiente y que se pueda combinar con otros procedimientos biológicos para el tratamiento de contaminantes ambientales.

Objetivos específicos

Determinar los efectos del antibiótico Ciprofloxacina y del colorante Cristal Violeta mediante el uso de la radiación gamma producida por una fuente de ^{60}Co en la Planta de Irradiación Semi-Industrial del Centro Atómico de Ezeiza en la Provincia de Buenos Aires. Utilizar distintas técnicas de laboratorio como espectrofotometría, Demanda Bioquímica de Oxígeno, Demanda Química de Oxígeno, ensayos de toxicidad aguda y crónica con *Daphnia magna*, *Chlorella vulgaris* y *Lactuca sativa*. Evaluar la factibilidad del uso de la radiación gamma para tratar efluentes industriales o domésticos con dichos contaminantes emergentes.

Índice

Agradecimientos	1
Introducción y objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Capítulo 1	7
Contaminantes Emergentes	7
Cristal violeta.	7
Ciprofloxacina.	8
Capítulo 2	9
Radiación gamma.	9
Generalidades.....	9
Cobalto-60	9
Métodos convencionales y no convencionales de tratamiento de efluentes	10
Aspectos generales de la radiólisis.....	11
Etapas de la radiólisis.	12
Especies predominantes y factores que condicionan el rendimiento radioquímico.....	13
Capítulo 3	15
Conceptos generales de ensayos biológicos y calidad del agua	15
<i>Daphnia magna</i>	16
<i>Lactuca sativa</i>	16
<i>Chlorella vulgaris</i>	17
Calidad del agua	18
Demanda Química de Oxígeno	18
Demanda Bioquímica de Oxígeno	19
Capítulo 4	20
Metodología experimental.....	20
Preparación e Irradiación de las muestras	20
Espectrofotometría.....	20
Ensayos toxicidad aguda con <i>Lactuca Sativa</i>	21
Ensayo toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	21
Ensayo toxicidad crónica con <i>Daphnia magna</i>	22
Ensayo toxicidad crónica con <i>Chlorella vulgaris</i>	22

DBO ₅	22
DQO	23
Capítulo 5	24
Curvas espectrales.....	24
Ciprofloxacina 100mg/L.....	24
Ciprofloxacina 5mg/L.....	26
Cristal violeta 2,5mg/L.....	26
Capítulo 6	28
Ensayos de toxicidad aguda	28
<i>Daphnia Magna</i> con CV	28
<i>Lactuca sativa</i> con CV	30
Ensayo de toxicidad crónica	32
<i>Chlorella vulgaris</i> con CV	32
<i>D. magna</i> con CIP.....	33
Capítulo 7	36
Evaluación de la calidad de agua.....	36
DBO ₅	36
DQO	38
Conclusiones.....	40
Bibliografía.....	42

Capítulo 1

Contaminantes Emergentes

La contaminación del agua es cualquier cambio químico, físico o biológico en la calidad de la misma que tiene un efecto dañino en cualquier organismo que allí viva o la consuma. El término de contaminantes emergentes (CE) generalmente se utiliza para referirse a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud. (Iannacone J., 2009).

Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de aguas residuales de tipo doméstico e industrial, de los residuos de las plantas de tratamiento, de los efluentes hospitalarios, de las actividades agrícolas y ganaderas y de los tanques sépticos, los cuales contienen un gran número de compuestos orgánicos y CE que se producen a diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han podido especificar y las plantas de tratamiento convencionales no están diseñadas para eliminarlos.

Los CE comprenden una amplia gama de compuestos químicos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, agentes tenso activos, plastificantes y aditivos industriales, que no están incluidos en el monitoreo actual de programas de tratamiento de aguas, de los cuales existe una limitada información disponible sobre el efecto que puede causar en la salud humana y en la ecología. Por lo tanto, de cara a una futura legislación de la presencia de este tipo de contaminantes en agua es necesario invertir en nuevas tecnologías de tratamiento, y continuar investigando con el fin de obtener tratamientos de agua más eficiente. (UNESCO, 2017)

Cristal violeta.

El **cristal violeta** es un colorante orgánico, sintético y alcalino, dentro de su fórmula molecular contiene un grupo trifenil-metano (Riaño, 2018) (Fig. 1), es de naturaleza catiónica y es aún más tóxico que sus equivalentes aniónicos debido a que interacciona fácilmente con la interfase de densidad negativa en la superficie de membranas celulares pudiendo ingresar fácilmente a la célula y concentrarse en el citoplasma (Faiza, 2017).

El cristal violeta (CV) se utiliza con distintos propósitos; como agente dermatológico, tinción de material biológico (Tinción de Gram), en la industria textil este colorante es usado para teñir distintos materiales, generalmente telas. Se estima que anualmente se producen un millón de toneladas a nivel global y que aproximadamente entre el 5 y 15% son vertidos sin recibir un adecuado tratamiento.

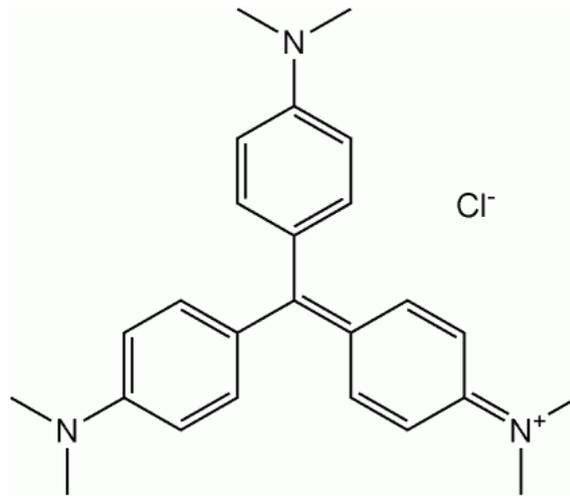


Figura 1: Estructura química del cloruro de tris(4-(dimetilamino)fenil)metilo, cristal violeta.

Ciprofloxacina.

La **ciprofloxacina** es un antibiótico de amplio espectro contra bacterias gram positivas y negativas, forma parte del grupo de las fluoroquinolonas, químicamente tiene una estructura bicíclica heteroaromática, constituida por un núcleo piridona- β -ácido carboxílico y un anillo aromático (Mella, 2000) (Fig. 2). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición del crecimiento bacteriano al interrumpir la replicación de DNA de la célula procarionota al unirse con la DNA girasa, un tipo IV de topoisomerasa, que queda bloqueada.

Su vida media en el organismo es de aproximadamente 4 a 6 horas, con un 50 a 70% de excreción sin metabolizar a través de la orina, 15% por la vía fecal y un 10 % es metabolizado por la vía CYP1A2 hepática (Martins, 2012).

En la actualidad se ha visto un aumento significativo en los niveles de antibióticos medidos en muestras aguas provenientes de fuentes naturales. Sus efectos ecotoxicológicos en el ambiente acuático aún no han sido investigados profundamente.

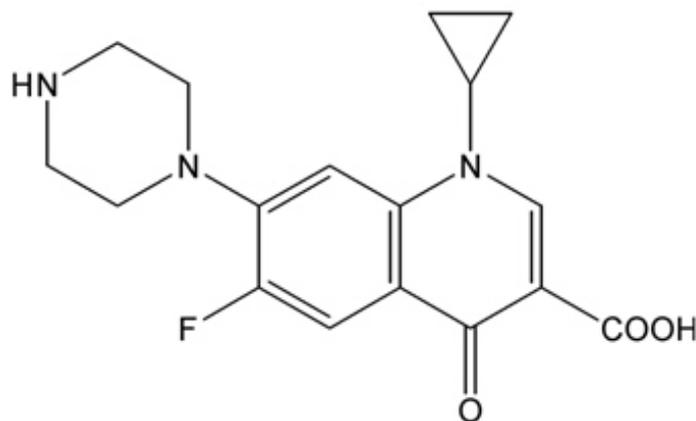


Figura 2: Estructura química, Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ilquinoli-3-carboxílico, ciprofloxacina.

Capítulo 2

Radiación gamma.

Generalidades

La radiación gamma es un tipo de radiación electromagnética constituida por fotones de alta energía. Suelen tener su origen en el núcleo excitado. Cuando éste la emite, no varía ni su masa ni su número atómico, sólo pierde una cantidad de energía proporcional a la frecuencia de la radiación emitida. Como todas las demás formas de radiación electromagnética, estas ondas no tienen masa ni carga, e interaccionan con la materia colisionando con las capas electrónicas de los átomos con los que se cruzan, perdiendo lentamente su energía, por lo que pueden atravesar grandes distancias. Tiene un gran poder de penetración, siendo capaz de atravesar cientos de metros en el aire, el cuerpo humano y las materias de poca densidad, así como láminas de acero y son detenidas solamente por capas grandes de hormigón, plomo o agua.

Cobalto-60

El Cobalto-60 (^{60}Co) es un isótopo radiactivo sintético del cobalto, con un período de semidesintegración de 5,27 años. ^{60}Co decae por desintegración beta al isótopo estable níquel 60 (^{60}Ni). En el proceso de desintegración, ^{60}Co emite un electrón con una energía de 315 KeV y luego el núcleo activado de ^{60}Ni emite dos rayos gamma con energías de 1,17 y 1,33 MeV, respectivamente. La desintegración es la siguiente:

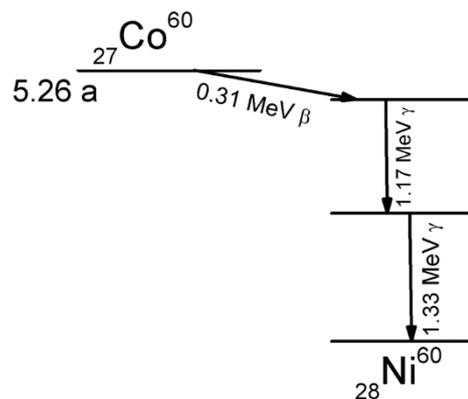
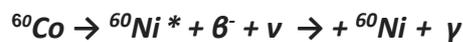


Figura 3: Proceso de desintegración del isótopo radiactivo Cobalto-60.

Las fuentes selladas con ^{60}Co se consiguen irradiándose en las centrales nucleares de potencia (Papadópolos, 1970). En Argentina se lo hace en la Central Nuclear de Embalse de tipo CANDU, en la provincia de Córdoba. El ^{59}Co se coloca en barras y están se usan para absorber los neutrones dentro del reactor, por medio de la siguiente reacción:



Una vez obtenido este radioisótopo, se lo traslada al Centro Atómico Ezeiza (CAE) en la provincia de Buenos Aires, donde la Planta de Irradiación Semi-Industrial (PISI) la utiliza con distintos propósitos como esterilización de productos médicos, irradiación de alimentos, síntesis de polímeros, tratamientos cuarentenarios, entre otras. PISI brinda servicios a terceros y a los distintos grupo de investigación del CAE. La actividad de la fuente es de aproximadamente $1 \times 10^6 \text{Ci}$.

Métodos convencionales y no convencionales de tratamiento de efluentes

En las últimas décadas ha aumentado considerablemente el volumen de aguas residuales a tratar, así como el número de sustancias contaminantes presentes en ella como los CE, lo que ha originado que las tecnologías convencionales empleadas en su tratamiento no sean eficaces en su eliminación o desinfección (López-Peñalver, 2010). Por ello, el desarrollo de nuevas tecnologías destinadas a su tratamiento son fundamentales para la sostenibilidad de muchos países. Es precisamente dentro de este contexto donde surge el uso de las radiaciones ionizantes, ya que pueden degradar tanto los compuestos tóxicos como los contaminantes biológicos.

Un ejemplo de esto lo constituyen las aguas residuales procedentes de la industria textil, en donde los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) convencionales, es decir, proceso Fenton, UV, ozonización o UV/O₃, no constituyen una alternativa adecuada para su tratamiento, mientras que el empleo de radiaciones ionizantes ha demostrado ser una buena opción (López-Peñalver, 2010).

Los PAOs implican la generación in situ de radicales libres muy reactivos, principalmente el radical $\cdot\text{OH}$, que reacciona con los contaminantes, degradándolos e incluso puede llegar a mineralizarlos (CO₂ y H₂O). En algunos casos, la vía oxidativa es muy lenta, siendo más favorable el empleo de radicales reductores como es el caso de los electrones solvatados o los radicales hidrógeno. De aquí que se plantee el tratamiento de las aguas contaminadas con radiaciones ionizantes como una buena alternativa, debido a que la irradiación del agua da lugar a la formación simultánea de especies radicalarias oxidantes y reductoras. Este hecho posibilita que su uso sea adecuado en el tratamiento de aguas contaminadas con una amplia variedad de contaminantes. Como fuentes de radiaciones ionizantes se pueden emplear emisores de radiación gamma, entre los que destacan los radionucleídos ${}^{60}\text{Co}$ y el ${}^{137}\text{Cs}$, o bien aceleradores de electrones.

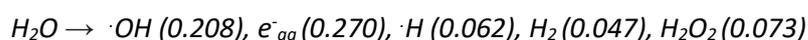
Debido a la gran variedad y complejidad de los efluentes no es posible establecer un protocolo estandarizado para el uso de las radiaciones ionizantes, siendo necesario el estudio de cada uno de los casos. Pero, como norma general, se puede afirmar que el uso de la radiación ionizante como método de tratamiento de las aguas contaminadas es factible, y económicamente rentable, cuando los tratamientos convencionales fallan (López-Peñalver, 2010).

Ventajas	Desventajas
Es un proceso físico que no requiere la adición de reactivos químicos.	Requiere altas dosis, lo que lleva aparejado altos costes de construcción.
Permite la eliminación simultánea de patógenos y contaminantes químicos.	Imposibilidad de establecer un protocolo estandarizado.
Generación de especies radicalarias muy reactivas.	Licenciamiento estrictamente regulado.
Generación simultánea de especies con un marcado carácter oxidante o reductor.	Pocos proveedores.
Compatibilidad con los métodos convencionales de tratamiento.	Requiere recarga de las fuentes.
Procesos controlables.	
Su eficacia es independiente de la turbidez del agua.	

Tabla 1: ventajas y desventajas en el uso de las radiaciones ionizantes en el tratamiento de aguas.

Aspectos generales de la radiólisis

La radiación es capaz de descomponer el agua, y es precisamente en este hecho en el que se basa el tratamiento. Esto le provoca su ionización y excitación, lo que da lugar a la formación de electrones altamente reactivos, iones radicales y radicales neutros que reaccionan con los solutos presentes en el agua. Cabe destacar que las aguas residuales se caracterizan por tener altas concentraciones de solutos pero, desde el punto de vista de la interacción de las radiaciones ionizantes, se consideran soluciones diluidas, y por tanto, prácticamente la totalidad de la energía suministrada se depositará en la molécula de agua, siendo despreciable la energía depositada sobre las moléculas de soluto. De forma general, se puede representar la radiólisis del agua mediante la ecuación:



Entre paréntesis se muestra el rendimiento radioquímico, G-Value, que cuantifica la probabilidad de la formación o la conversión de una especie cuando se absorbe en el medio una energía de 100 eV.

Etapas de la radiólisis.

El fenómeno inicial en la interacción de la radiación con la molécula de agua es la absorción de la radiación en el medio (Fig. 4), en un intervalo de tiempo del orden de los 10^{-18} s, para a continuación producirse los fenómenos de excitación e ionización de la molécula de agua en la etapa física, dando lugar a moléculas muy inestables.

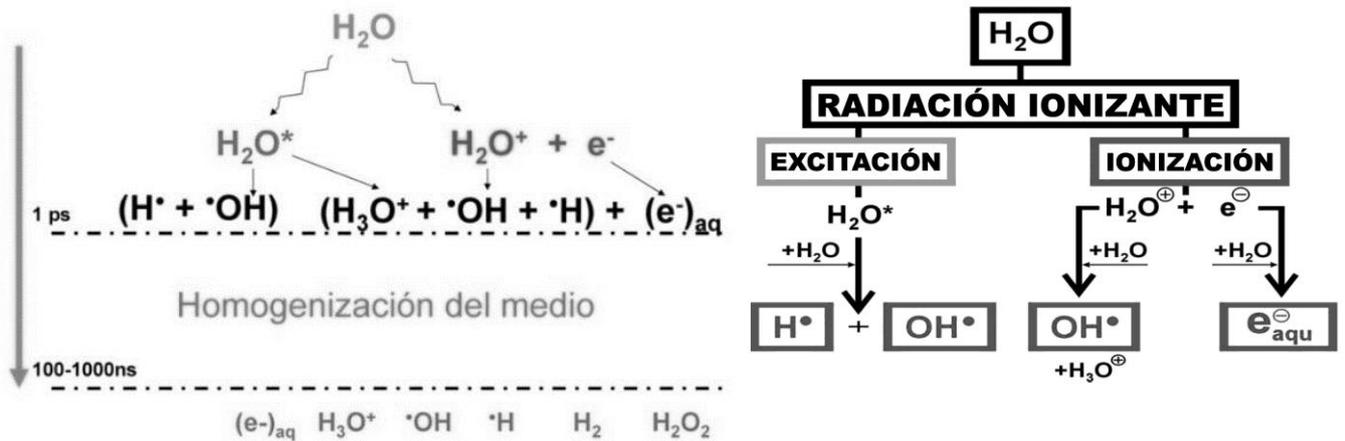
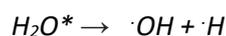


Figura 4: Etapas de la radiólisis del agua y especies predominantes en la excitación e ionización.

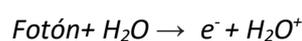
Tiempo	Etapas
10^{-18} s	Absorción de la radiación ionizante
10^{-16} s	Procesos físicos: Ionización Excitación
10^{-12} s	Procesos fisicoquímicos: Formación de radicales libres Rotura de enlaces químicos
10^{-12} s - 10^{-6} s	Procesos químicos: Reacción de los radicales libres

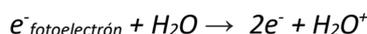
Tabla 2: Etapas de la radiólisis del agua en el tiempo

Las moléculas de agua excitada se disocian en menos de 10^{-16} s para formar radicales libre:

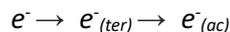


La ionización del agua se produce por la absorción de un fotoelectrón (efecto fotoeléctrico) o electrón Compton, requiriéndose para ello tan sólo 13 eV. El desplazamiento de un electrón de la molécula de agua origina el radical iónico H_2O^+ y un electrón con una determinada energía cinética:





Por otro lado, el electrón liberado en el momento de la ionización, e^- , con una determinada energía cinética, se estabiliza mediante colisiones elásticas sucesivas con moléculas de agua, transformándose en un electrón termalizado, que se rodea de moléculas de agua para formar un electrón hidratado, que recibe el nombre de electrón acuoso.



En la **etapa fisicoquímica**, las especies formadas no se desplazan significativamente, generando zonas muy heterogéneas, con una elevada concentración local de especies radicalarias y moleculares, donde se ven favorecidas las reacciones de recombinación de los radicales formados frente a los mecanismos de difusión. En estas regiones las especies predominantes son: $\cdot OH$, $\cdot H$ y H_3O^+ .

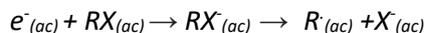
En **etapa química**, se completa la homogenización del medio después de 10^{-9} s, transformándose el medio sobre el que incide la radiación en una solución homogénea de radicales libres y productos moleculares, tales como $e^-_{(ac)}$, H_3O^+ , $\cdot H$, H_2 , $\cdot OH$, H_2O_2 .

Especies predominantes y factores que condicionan el rendimiento radioquímico.

Según los G-values tabulados (López-Peñalver, 2010), las especies que predominan en agua pura con un pH=7,00 son el $\cdot OH$, $e^-_{(ac)}$ y el $H\cdot$.

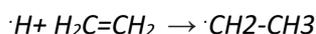
El radical hidroxilo es un oxidante fuerte, que posee un potencial estándar de reducción aproximadamente en 2,7V en soluciones ácidas y 1,7V en soluciones neutras. En las reacciones de adición, actúa como un electrófilo, haciendo perder al sustrato un enlace π , para general dos nuevos enlaces σ .

Por otro lado, el electrón acuoso posee un potencial estándar de reducción de -2.9V. Frente a compuestos orgánicos actúa como un nucleófilo, actuando preferentemente sobre dobles enlaces sustituidos o sobre anillos aromáticos. La velocidad de reacción es mayor cuando el compuesto orgánico posee sustituyentes halogenados, ya que forma una molécula cargada negativamente que rápidamente descompone formando el ion halogenuro y un radical



El átomo de hidrógeno es el ácido conjugado de $e^-_{(ac)}$. Posee un potencial de reducción de -2,4V, menor que el electrón acuoso, y su comportamiento químico suele ser muy diferente.

Reacciona con compuestos orgánicos extrayendo átomos de hidrógeno de enlaces saturados o adicionándose a centros insaturados.



Además, la concentración de los productos formados en el proceso radiolítico del agua depende de factores tales como:

- **La temperatura** : Modifica la constante de difusión de los radicales
- **pH de la solución** : varía poco en los intervalos entre 5,00 y 8,00
- **La transferencia lineal de energía (LET)**: Al aumentar su valor, se incrementa el G-value de las especies moleculares.
- **La dosis absorbida**: A mayor dosis, mayor será la concentración de radicales y moleculares en el medio
- **La tasa de dosis**: Su aumento implica un aumento de las especies radiolíticas primarias formadas.
- **La presencia de gases disueltos** tales como O₂, N₂O y O₃ favorece la formación de determinadas especies radicalarias o moleculares, lo que se traduce en el detrimento de otras.

Capítulo 3

Conceptos generales de ensayos biológicos y calidad del agua

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas enzimáticos, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Por lo tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o la biocenosis (conjunto de seres vivos que viven y se reproducen en determinadas condiciones de un medio o biotopo), y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico (Castillo, 2004, 1° edición).

El potencial nocivo de una sustancia tóxica puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, entre otras. Por lo tanto, la toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico.

Además, se debe considerar que el efecto tóxico sobre los sistemas biológicos es ejercido por la acción combinada de todas las sustancias nocivas presentes en el medio, incluso aquellas que no son tóxicas en sí, pero que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema, y consecuentemente las condiciones de vida de los organismos.

En los sistemas acuáticos es característico el caso de sustancias que agotan el oxígeno, o que son coloreadas, o que simplemente impiden la propagación de la luz (material particulado). También se deben tener en cuenta aquellos efectos no directamente relacionados con sustancias, tales como el deterioro o daño producido por acción de cambios en la temperatura o por radiación.

Los resultados de los bioensayos se refieren, en primer lugar, a los organismos usados en el ensayo y las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. Un efecto nocivo evaluado por medio de ensayos biológicos normalizados puede indicar niveles de peligrosidades trazables y asimilables a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis.

En principio, se debe considerar que no existe ningún organismo ni biocenosis que pueda ser usado para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes. En la práctica, solamente unas pocas especies (especies modelo), que representen funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas. En general, los criterios de selección de especies se fundamentan en los siguientes aspectos:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.

- Representatividad de su nivel trófico.
- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

Daphnia magna

Dentro del grupo de cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. Los cladóceros son crustáceos braquiópodos cuyo cuerpo está recubierto por un caparazón a excepción de la cabeza y las largas antenas nadadoras (Fig. 5). La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (forma de reproducción basada en el desarrollo de células sexuales femeninas no fecundadas lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal. Es por ello que existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *D. magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, entre otros. (Castillo, 2004, 1° edición)



Figura 5: Morfología del cladóceros, *Daphnia Magna*.

Lactuca sativa

Comúnmente conocida como lechuga, es una planta herbácea propia de las regiones semi templadas que se cultiva como alimento (Fig. 5A). Su uso como bioensayo se basa en el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas y los bajos costos asociados.

En la prueba estática de toxicidad aguda en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos o mezclas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento (Fig. 5B). Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula o del hipocótilo. Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de

desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta (Castillo, 2004, 1° edición).

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola.

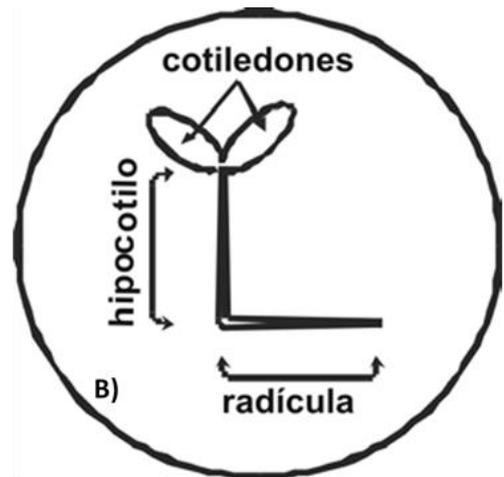


Figura 6: A) Semilla de lechuga, *Lactuca Sativa*. B) germinación de la semilla y desarrollo de la plántula durante los primeros días.

Chlorella vulgaris

Es un alga verde unicelular del filo *Chlorophita*. Tiene forma esférica y mide entre 2 y 10µm de diámetro y no posee flagelo (Fig. 7). Su color es verde debido a la clorofila A y B presentes en su cloroplasto. A través de la fotosíntesis se multiplican rápidamente, solo precisando CO₂, H₂O, luz solar y algunos minerales para desarrollarse.

Su simplicidad de condiciones para que prolifere, los bajos costos de mantenimiento y la facilidad de adquirirlas, hacen a esta alga una buena opción para realizar los ensayos de ecotoxicidad y que sean representativos del ecosistema de agua dulce donde viven (Castillo, 2004, 1° edición).

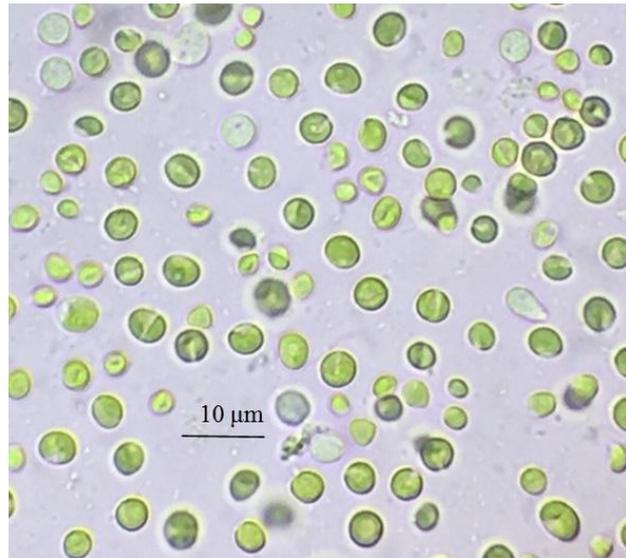


Figura 7: Morfología del alga unicelular, *Chlorella vulgaris*.

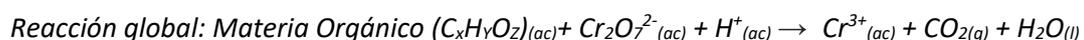
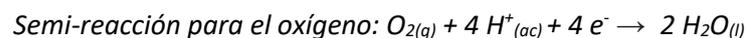
Calidad del agua

Se refiere a las características químicas, físicas, biológicas y radiológicas del agua. Es una medida de su condición en relación con los requisitos de una o más especies bióticas o a cualquier necesidad humana o propósito. Se utiliza con mayor frecuencia por referencia a un conjunto de normas contra las cuales puede evaluarse su cumplimiento. Los estándares más comunes utilizados para evaluar la calidad del agua se relacionan con la salud de los ecosistemas, seguridad de contacto humano y agua potable.

Los distintos parámetros fisicoquímicos que constituyen la calidad del agua son la temperatura, conductividad, turbidez y materia en suspensión, oxígeno disuelto (OD), demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO).

Demanda Química de Oxígeno

Muchos contaminantes se pueden oxidar a altas temperaturas con dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), lo cual constituye un método analítico habitual para la determinación de materia orgánica en residuos. Se define la Demanda Química de Oxígeno como la cantidad de O_2 químicamente equivalente al $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ consumido en este proceso. Dicha equivalencia (en medio ácido) queda establecida a partir de las siguientes reacciones de reducción-oxidación:



Se cuantifica la cantidad de Cr^{3+} que aparece y se relaciona con la cantidad que se requeriría para oxidar una cantidad equivalente de material orgánico. Cada $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ consume 6 electrones al reducirse, mientras que cada molécula de oxígeno consume 4 electrones. Por consiguiente, el consumo de 1mol de

$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ en la oxidación es equivalente al consumo de 1,5 moles de O_2 . La determinación de la DQO se utiliza para la caracterización y regulación de la emisión de desechos industriales. El campo normal de variación de la DQO en este tipo de vertidos oscila típicamente en el intervalo 200-4000 mg de O_2/L . Una DQO alta indica la presencia de grandes cantidades de compuestos orgánicos en la muestra (Harris, 2004).

Demanda Bioquímica de Oxígeno

La DBO es uno de los parámetros de mayor importancia en el estudio y caracterización de las aguas no potables. La determinación de DBO además de indicarnos la presencia y biodegradabilidad del material orgánico, es una forma de estimar la cantidad de oxígeno que se requiere para estabilizar el carbono orgánico y de saber con qué rapidez este material va a ser metabolizado por las bacterias que normalmente se encuentran presentes en las aguas residuales. La importancia de este parámetro requiere de ciertos cuidados y atención en la técnica analítica, ya que por ser un proceso biológico el manejo y tratamiento de la muestra es delicado. (Villamizar, 2008). El valor obtenido de DQO es siempre superior a la DBO, ya que se oxidan por este método también las sustancias no biodegradables.

Capítulo 4

Metodología experimental

Preparación e Irradiación de las muestras

Se prepararon soluciones debidamente rotuladas en frascos de vidrio de dimensiones 6,5cm de diámetro y 12cm de alto, con una capacidad de 300mL (Fig. 8). A cada dosis le correspondió tres frascos de la misma solución, ya que en esas condiciones se realizó el mapeo. Se le ajustó el pH a 8,00 porque el rendimiento radioquímico depende del pH y se entregaron en la PISI.

Luego de la irradiación, el Laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis se encargó de medir la dosis máxima y mínima del arreglo de frascos con dosímetros de alanina, de acuerdo a la Norma Iram 39008, para corroborar que la dosis haya sido la adecuada (IRAM, 2015). Los dosímetros utilizados contienen cristales de alanina y son los que registran la dosis absorbida por la formación de radicales libres derivados de ella. La identificación y medición de estos radicales se realizaron en el equipo de Resonancia Paramagnética Electrónica. La tasa de dosis que recibieron las muestras fue de 10 KGy/h aproximadamente. La actividad de la fuente desde que comenzaron los ensayos hasta que finalizaron fue de 684.058Ci y 675.249Ci, respectivamente.

Una vez irradiadas las muestras, se le ajustó nuevamente el pH a 8,00 ya que todos los ensayos posteriores lo requerían. El pH-metro utilizado en todas las mediciones fue pH8+DHS Stirrer.



Figura 8: Frascos de 300ml, donde se colocaron las soluciones.

Espectrofotometría

Para la obtención de los distintos espectros de CIP y CV, así como de la determinación de la absorbancia del $\text{Cr}^{3+}_{(\text{ac})}$ para DQO se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 1800, con una resolución de ancho de banda de hasta 1nm. Los gráficos y análisis de resultados se procesaron con UV Prove 2.33. Todas las soluciones fueron preparadas con agua destilada como solvente y se las colocaron

en cubetas de cuarzo debido a que se abarcaron longitudes de onda en el visible y en el ultravioleta. En todos los casos se midió a temperatura ambiente.

Para las curvas espectrales se hicieron correcciones de la línea de base y para medir absorbancia también se hicieron blancos de reactivos, que consta de todos los compuestos, incluidos el solvente, sin el soluto de interés. Esto permitió ajustar la transmitancia en 100% para sólo ver el efecto del compuesto en cuestión.

Ensayos toxicidad aguda con *Lactuca Sativa*

En las placas Petri se colocaron papel de filtro, previamente autoclavados, del mismo diámetro y se le vertieron 3mL de la solución a estudiar en cada una, incluyendo el control positivo de ZnSO₄ y el control negativo con agua destilada con que se prepararon las soluciones de CIP y CV. Las dosis que se sometieron a este ensayo fueron una concentración de 2,5mg/l de CV a dosis 0Gy, 300Gy, 500Gy, 600Gy, 800Gy, 1000Gy, 1500Gy y 2000Gy. Además, también se evaluó una solución mezcla de CIP (5mg/L) y CV (2,5mg/l) a 0Gy y a 1,5Gy.

Con la ayuda de una pinza, se colocaron cuidadosamente 20 semillas de La Huerta Orgánica, cosecha 2019, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces. El ensayo se realizó por triplicado por cada dosis a evaluar.

Se colocaron films para evitar la pérdida de humedad, se las taparon y se las dejaron 120 horas (5 días) a una temperatura de 22°C ± 2°C expuestas a la luz.

Terminado el periodo de exposición, se decidió cuantificar la elongación del hipocótilo de cada placa. La bibliografía recomienda medir el hipocótilo, la radícula o el efecto en la germinación (Castillo, 2004, 1° edición).

Ensayo toxicidad aguda con *Daphnia magna*

El pool de organismos se mantuvo en el medio APHA preparado en el laboratorio. Este medio de pH entre 7,6 y 8 se preparó según las indicaciones de la norma (APHA, 1998). Los individuos se crían en una cámara climática POL-EKO, a una temperatura configurada de 21 a 23°C, una humedad relativa del 50%, circulación de aire del 100% y un fotoperíodo de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz. Todas estas son condiciones óptimas estandarizadas para el desarrollo y reproducción de los organismos.

El ensayo de toxicidad consistió en seleccionar neonatos de aproximadamente 24 horas de vida. Se tomaron 10 neonatos, se los colocaron en un recipiente de 25 ml y se les agregó 2 ml del tóxico a evaluar. Se realizaron 5 réplicas por cada muestra. Se realizaron controles negativos y positivos. En el control negativo se sometió a los neonatos al medio APHA, mientras que en el control positivo se sometió a los individuos a un tóxico de referencia de concentración conocida, Cr₂O₇²⁻. En este ensayo se evaluó una concentración de 2,5mg/L a dosis de 0Gy, 300Gy, 500Gy, 600Gy, 800Gy, 1000Gy, 1500Gy, 2000Gy.

Una vez realizado lo antes descrito; se los rotuló, se los envolvió en papel aluminio para aislarlos de la luz y se esperó 48 horas para contar el porcentaje de mortalidad de cada muestra. Para poder

hacerlo, se recurrió al uso de una lupa binocular. La completa inmovilización era claro indicativo que estaban muertas.

Para validar el ensayo el control negativo no debe superar el 10% de mortalidad y el control positivo, debe obtener una mortalidad del 100%, ya que la concentración que se utiliza ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ -0,56mg/l), se sabe de ante mano; produce ese efecto.

Ensayo toxicidad crónica con *Daphnia magna*

Se seleccionaron neonatos de los frascos en la cámara climática y se colocó uno por cada tubo de ensayo. Se realizó un control negativo con 23 tubos conteniendo 10mL de medio APHA, 50 tubos con 10mL de ciprofloxacina 5mg/L sin irradiar y 50 tubos más con la misma solución pero irradiada previamente con 1,5kGy.

Tanto en el control como en los tubos con presencia del fármaco, se los alimentó 3 veces por semana con una suspensión algal de *chorella vulgaris* y se les recambió el medio una vez por semana.

El ensayo duro 21 días, todos los días se controlaba cada uno de los tubos de ensayos con *D. magna* y se observaba cuidadosamente el estado en que se encontraban; se registraban si el individuo permanecía vivo o muerto y si había dejado descendencia o no. En el caso que dejara descendencia se contabilizaba el número de neonatos y se los retiraba del tubo de ensayo. Para validar este ensayo el control negativo no debía superar el 10% de mortalidad al finalizar el ensayo. (Juárez, 2010).

Ensayo toxicidad crónica con *Chlorella vulgaris*

Se utilizó *Chlorella vulgaris* y se midió su concentración celular mediante el uso de la Cámara de Neubauer. Para iniciar el ensayo fue necesario partir con una concentración inicial en el orden 1×10^6 células/mL. El ensayo se realizó con luz continua blanca y una temperatura que ronde los 24 °C y se midió durante un periodo de 72hs (ISO8292, 2015). Se utilizaron soluciones de CV de 2,5mg/L irradiadas a 300, 800 y 2000Gy.

Se colocó en cada tubo de ensayo 5ml de las soluciones a evaluar y además se colocaron 5mL de la suspensión algal en cada tubo. Se utilizó por cada dosis tres réplicas y dos replicas para los controles positivos y negativos. En el control positivo se utilizó como tóxico de referencia $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ y para el control negativo medio BBM. Esto se realizó en un flujo laminar para mantener la esterilidad de las algas. Posteriormente se agitaron los tubos al menos tres veces al día con un vórtex y cada día se fue midiendo la concentración de células presentes en cada tubo.

DBO₅

Se realizó por el método Respirómetro (APHA5210D). Se procedió a armar el agua de dilución, por cada litro de agua de destilada, se le colocó 1mL de una solución tampón fosfato (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Y NH_4Cl), 1mL de una solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mL de una solución de CaCl_2 y 1mL de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

En todos los casos se realizaron los ensayos en frascos de Winkler de 300mL y se dejó incubar 5 días a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a plena oscuridad para evitar fenómenos fotosintéticos.

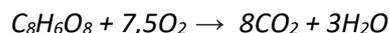
- Los frascos blancos sólo tenían agua de dilución.
- Los frascos con simiente, fueron llenados con agua de dilución y se le adicionaron 2ml de la simiente. Este fue realizado 48 horas previas al ensayo para lograr la fase de crecimiento exponencial bacteriano; creado a partir de agua del Arroyo Aguirre para darle los nutrientes y micronutrientes necesarios, mezclados con materia fecal de perro para obtener los microorganismos requeridos en el ensayo.
- Los frascos con solución estándar, se llenaron con agua de dilución, se les agregó 2 ml de semiente y 6 ml de solución glucosa/glutamato.
- Los frascos con muestras a analizar, se llenaron con agua de dilución, 2 ml de simiente y solución de CV irradiada y sin irradiar.

La concentración de oxígeno inicial y final se midió con el oxímetro OxiCal-SL 730 tratando de mantener las condiciones de temperatura para evitar fluctuaciones de la concentración de oxígeno disuelto, el cual depende fuertemente (Young, 2015).

DQO

Se precalentó el reactor a 160°C unas horas previas al ensayo. Se emplearon viales marca HACH para determinar DQO por el método de digestión en reactor (aprobado por la US-EPA), indicado para agua y muestras de agua. Debido a que los viales son pequeños respecto al digestor Carbolite, se envolvió cada tubo con papel aluminio para permitir una mejor conducción de calor (Vogt, 2017).

Cada vial tenía la solución de ácido sulfúrico, conteniendo H_2SO_4 y Ag_2SO_4 y la de digestión que posee $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2SO_4 y HgSO_4 . Para la calibración se usó una solución de concentración conocida de ftalato ácido de potasio. El estándar de DQO teórico es de $1,176\text{mgO}_2/\text{mg}$ ftalato según la ecuación para la completa oxidación:



Para el blanco en vez de esta solución se colocó agua destilada y para la muestra problema la solución de interés. Luego de dos horas de digestión, se lo dejó alcanzar la temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 420nm , uno de los picos característicos del $\text{Cr}^{3+}_{(\text{ac})}$, para poder conocer la DQO según la calibración correspondiente.

Capítulo 5

Curvas espectrales

Ciprofloxacina 100mg/L

Luego de la irradiación de los frascos a distintas dosis (3, 6, 9, 12kGy) con CIP de 100mg/L, se advirtió que las soluciones dejaron de ser transparentes para adoptar un color amarillo pardo, que se intensificó al aumentar la dosis como se muestra a continuación (Fig. 9):



Figura 9: Soluciones de CIP 100mg/L irradiadas a dosis crecientes.

Además de ello, se midió el pH antes y después de la irradiación. El pH disminuyó más a mayor dosis recibida. Posiblemente se debió a la creación de nuevas moléculas con grupos funcionales ácidos. Para evitar cambios espectrales, se ajustó nuevamente el pH a 8,00.

Dosis (kGy)	pH inicial	pH final
0	8,11	8,08
3	8,05	6,47
6	8,05	6,41
9	8,01	6,35
12	8,02	6,01

Tabla 3: Variación del pH de soluciones irradiadas de CIP 100mg/L

La curva espectral se realizó entre las longitudes de onda de 288 y 565nm y se observó uno de los picos a los 330nm, característico de la CIP (Murtaza, 2015). A medida que aumentó la dosis, el pico fue menor ya que depende linealmente con la concentración de acuerdo a la Ley de Lambert y Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Donde A corresponde a la absorbancia, b al espacio óptico (1cm) y ε a la absorptividad molar, dependiente de la naturaleza de la molécula y la temperatura.

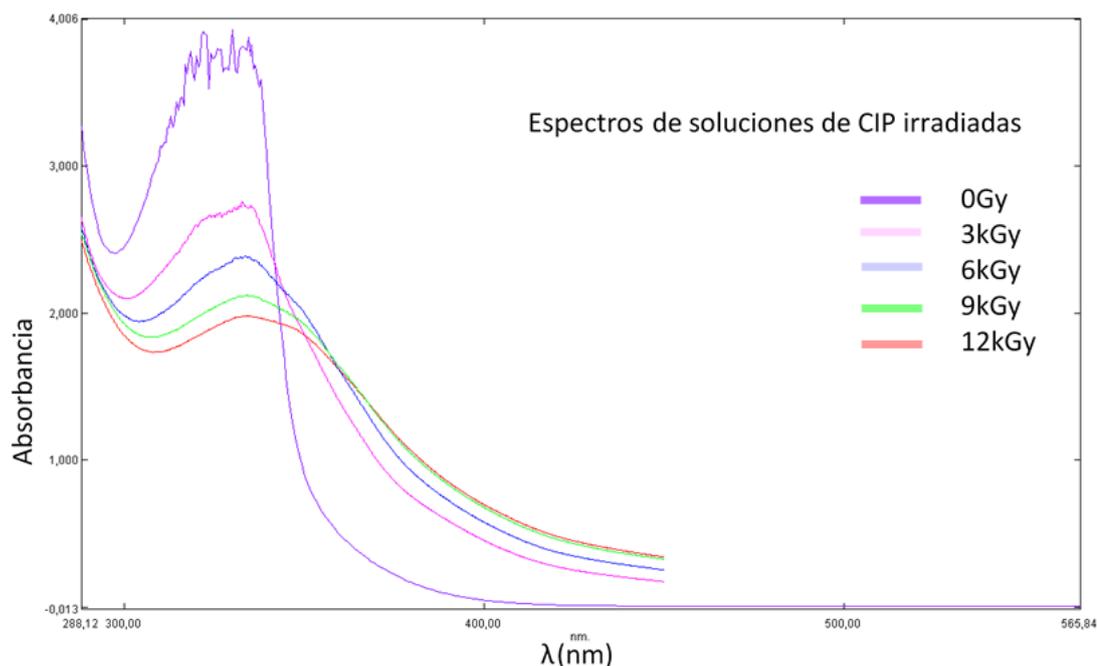


Figura 10: Espectros de CIP a 100mg/L a distintas dosis.

Se observó que incluso a dosis muy altas, de hasta 12kGy, a esa concentración no se pudo degradar completamente, e incluso a medida que aumentó la dosis, no sólo disminuyó la absorbancia, sino también el espectro se corrió a longitudes de onda mayores, y por lo tanto a energías menores. Este efecto se denomina batocrómico y pudo deberse a cambios estructurales de las moléculas.

Como se mencionó anteriormente, las principales especies generadas en la radiólisis (e^-_{aq} y $HO\cdot$) actúan como nucleófilo o electrófilo en las reacciones de adición. Especialmente el e^-_{aq} tiene la capacidad de reaccionar con los sustituyentes halogenados de anillos aromáticos, formando una molécula cargada negativamente que rápidamente se descompone generando el ion halogenuro (X^-) y un radical.

El hecho de que CIP tenga un átomo de flúor como sustituyente y se lo haya enfrentado a estas especies pudo haber hecho que se lo removiera. Como este átomo es el más electronegativo de la tabla periódica, los electrones conjugados de la molécula estarían en niveles energéticos más altos y por lo tanto el salto de la transición electrónica enlazante-antienlazante del orbital molecular es menor y la longitud de onda en la que absorbe es mayor.

Debido a los resultados antes mencionados, no se procedió a seguir aumentando la dosis de radiación para verificar la eliminación completa del fármaco, ya que se observó que los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* arrojaron que dosis de radiación alta estaban generando especies más tóxicas que la solución de CIP original, esto se alejaba al objetivo de este trabajo de investigación, que es utilizar la radiación gamma como método alternativo para reducir la toxicidad de los compuestos emergente y para poder lograr la completa desintegración se requerían dosis muchísimo más altas, alrededor de 100KGy; que no pudieron ser alcanzadas con los materiales con los que contábamos y el tiempo que se disponía para la realización del Proyecto.

Ciprofloxacina 5mg/L

Se hizo un barrido espectral de una solución de CIP pero esta vez de concentración 5 mg/L que sí pudo ser degradada completamente a una dosis más asequible de 1500Gy.

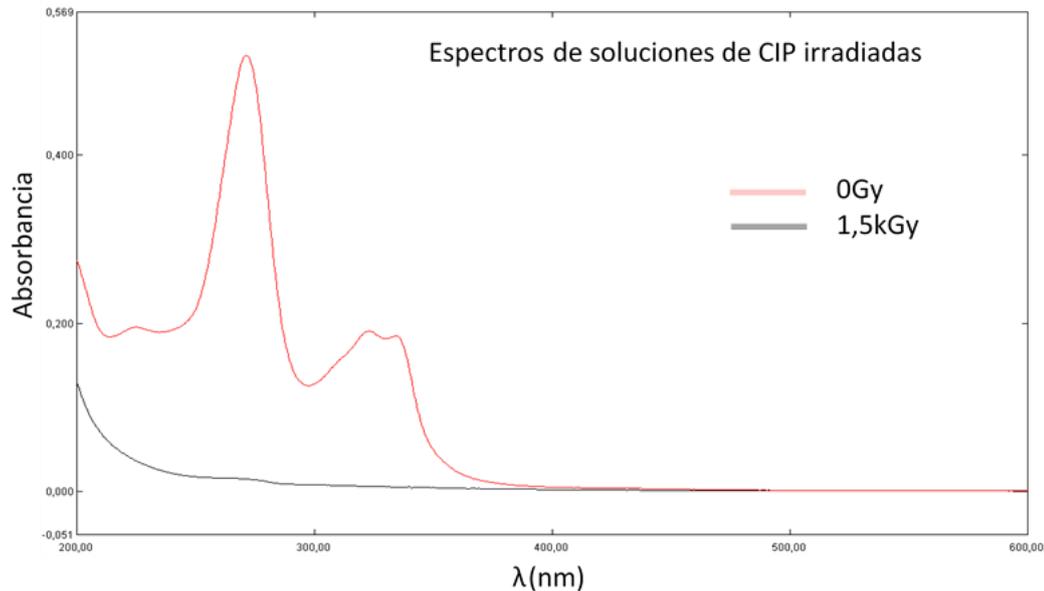


Figura 11: Espectros de solución de CIP irradiada con 1,5kGy y sin irradiar.

Dos claros picos, uno a 330nm y otro a 275nm se identificaron claramente a las soluciones sin irradiar. Ambos correspondientes a la CIP (Murtaza, 2015). En cambio, cuando se irradió con 1500Gy ambos desaparecen por completo, indicando que fue degradada en su totalidad. De todas maneras, esto no significa que no se hayan producido otras especies y que estas no absorban en el espectro UV-VIS. Para poder determinar qué sustancias se generaron durante la degradación habría que utilizar otra técnica como Cromatografía Gaseosa (GC) o Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) acoplada a un Espectrómetro de Masa (MS), escapando de los alcances de este trabajo.

Cristal violeta 2,5mg/L

En el caso de CV a 2,5mg/L, a medida que aumentó la dosis absorbida, la tinción violeta oscura cambió de tonalidad, cada vez haciéndose más clara hasta llegar a dosis las cuales quedaron transparentes. El barrido espectral se hizo de 400 a 800nm.

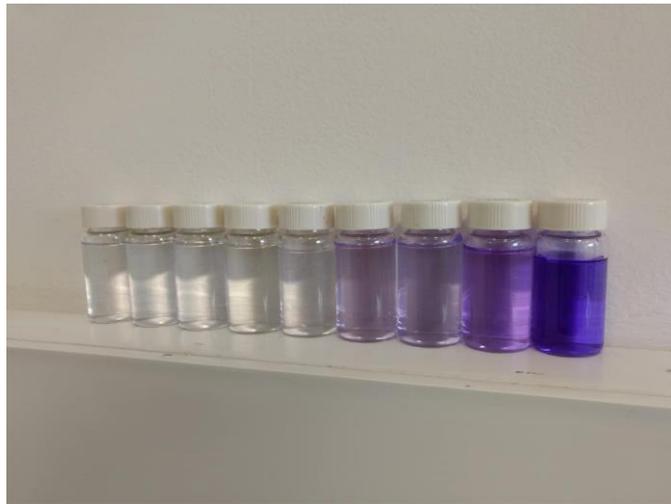


Figura 12: Soluciones de CV 2,5mg/L a distintas dosis.

Se realizaron los barridos espectrales a dosis de 2000, 800, 500, 300, 0Gy. El pico característico de CV a 590nm disminuyó al aumentar la dosis hasta el punto en el cual se eliminó casi por completo a 800Gy. Nuevamente, esto no excluyó la posibilidad de que los productos de degradación estuvieran presentes pero no aparecieran en el espectro visible porque allí no absorben.

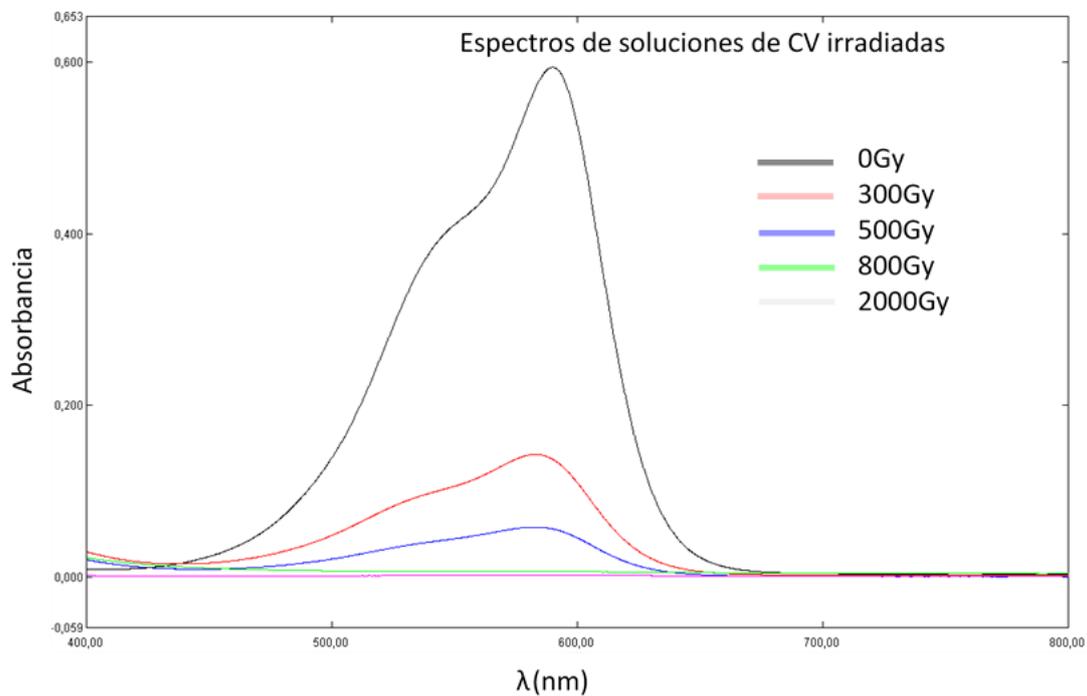


Figura 13: Espectros de soluciones de CV 2,5mg/L a distintas dosis.

Capítulo 6

Ensayos de toxicidad aguda

Daphnia Magna con CV

Primeramente, se realizaron las pruebas de mortalidad de estos organismos a distintas concentraciones de CV y CIP (Tabla 4).

		Sobrevida 48hs (%)
	Control Positivo	0
	Control Negativo	100
CV (mg/L)	2,5	0
	5	0
	15	0
	30	0
CIP (mg/L)	75	85
	100	0
	150	2,5
	200	0

Tabla 4: Sobrevida a las 48hs de neonatos de *D. magna* con CIP y CV a distintas concentraciones.

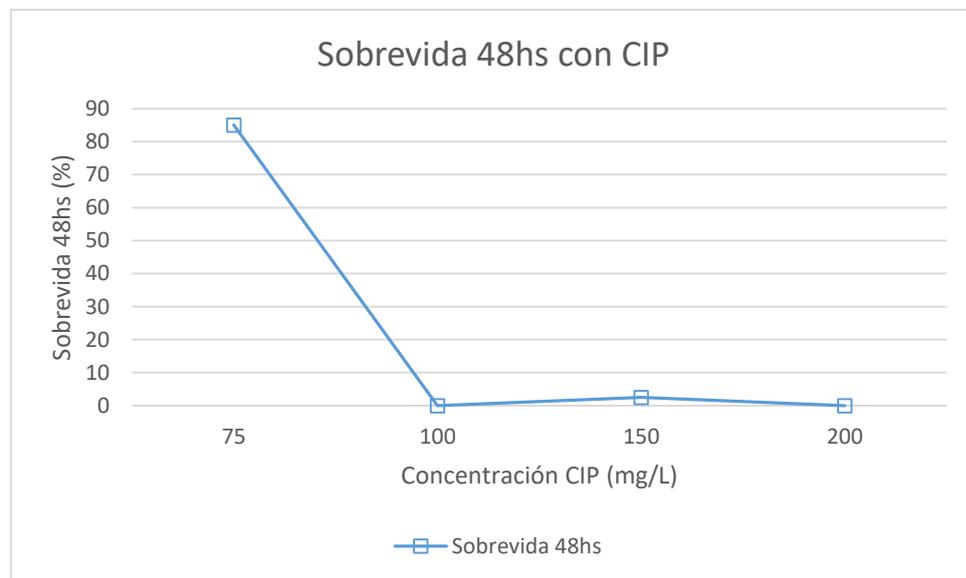


Figura 14: Curva de sobrevivencia de *D. magna* con CIP

A cualquiera de todas las concentraciones de CV se generó el 100% de la muerte de la población, mientras que para CIP, la dosis letal 50 (DL_{50}) fue de aproximadamente 85,7mg/L. Como se vio con anterioridad, a esas concentraciones las dosis que hay que utilizar son muy grandes y además generan

compuestos más tóxicos que la solución sin con CIP, por lo tanto se optó sólo por el uso de CV para la prueba de toxicidad aguda con *D. magna*.

Una vez elegido el contaminante y su concentración que fue de CV de 2,5mg/L, se irradiaron con distintas dosis para realizar el ensayo de toxicidad aguda y luego pasadas las 48hs se contaron las que quedaron vivas respecto al control negativo.

En las siguientes imágenes se puede observar cómo se armó el experimento y a la vez cómo quedaron los crustáceos cuando estaban en contacto con el colorante sin irradiar o no:

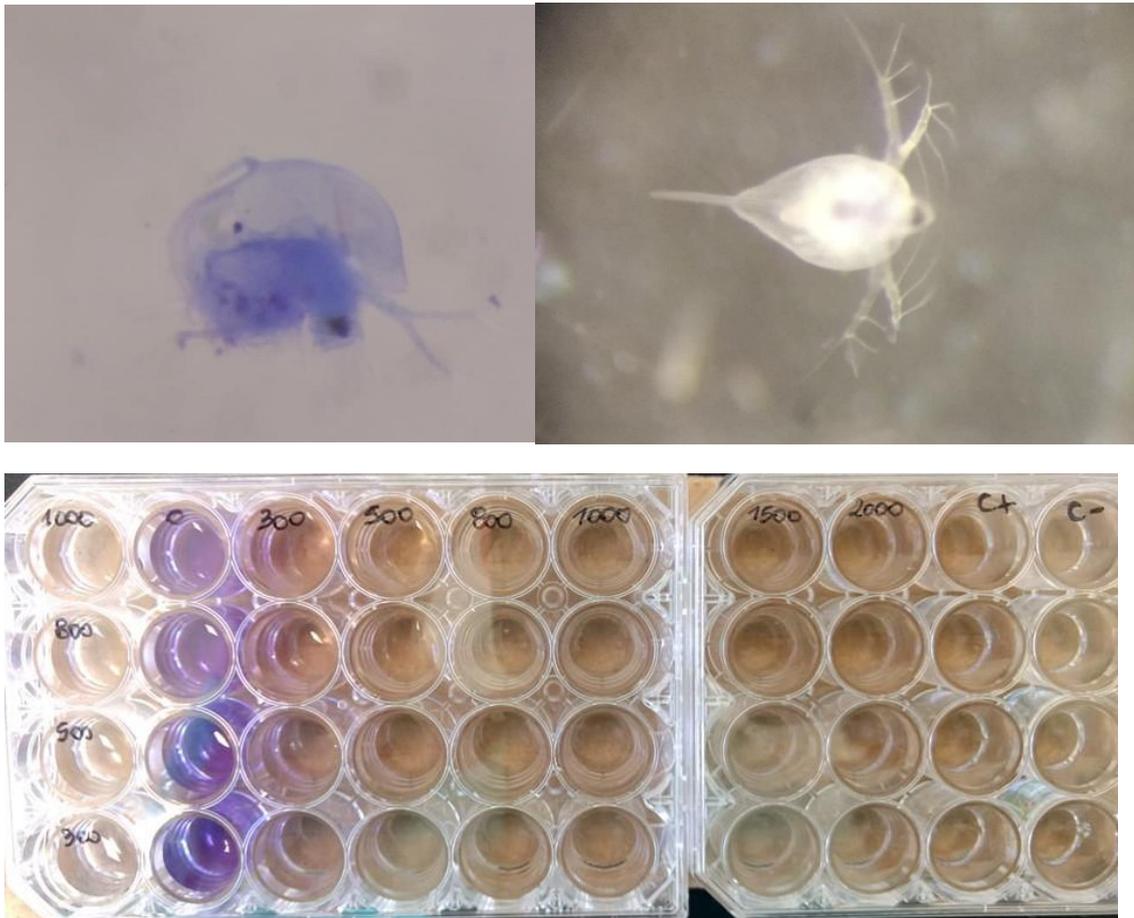


Figura 15: *D. magna*s muertas luego de los ensayos, una con una solución sin irradiar, y otra a dosis elevadas. Placas con wells donde se trabajó.

Respecto a los resultados, tanto el control positivo con $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ y el negativo con medio APHA fueron los esperados y validaron el ensayo. Los controles no excedieron el 10% permitido.

A dosis bajas (incluido a 0Gy), pareció que incorporan el colorante sin capacidad de excretarlo o metabolizarlo apropiadamente. La mortalidad a dosis bajas fueron el 100% o cercana a este valor por lo que claramente se puede concluir que el CV es tóxico en estas condiciones.

Por otro lado, a medida que aumentó la dosis, disminuyó la mortalidad hasta un valor de 1000Gy, donde aumentó levemente. Esto puede sugerir la generación de un nuevo compuesto que no fue mensurable mediante espectrofotometría, pero que indujo cierto grado de toxicidad sobre la población.

Luego de este valor, la tendencia sigue en decrecimiento hasta los 2000Gy y arrojó una mortalidad de 5%, muy parecido a lo que dio el control negativo (Tabla 5).

	Vivas/total	Sobrevida 48hs (%)	Mortalidad 48hs (%)
Control positivo	0/48	0	100,00
Control negativo	43/46	93,47	6,53
Dosis (Gy)			
0	0/36	0	100,00
300	0/50	0	100,00
400	4/48	8,33	91,67
500	8/44	18,18	81,82
600	13/39	33,33	66,67
800	22/42	52,38	47,62
1000	20/42	47,62	52,38
1500	10/16	62,50	37,50
2000	19/20	95,00	5,00

Tabla 5: Mortalidad de *D. magna* con CIP 5mg/L a varias dosis.

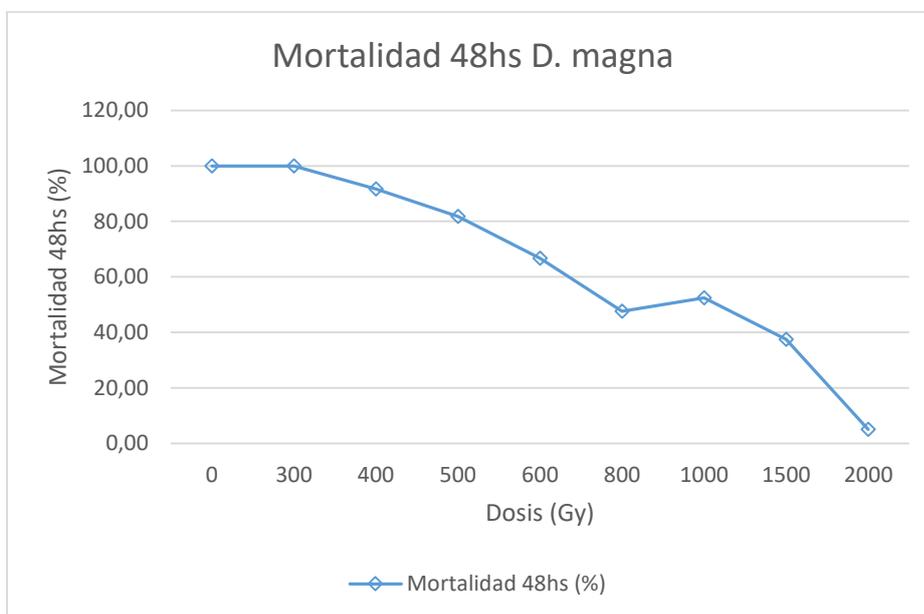


Figura 16: Curva de mortalidad a las 48 hs de *D. magna* con soluciones irradiadas de CIP a distintas dosis.

Lactuca sativa con CV

En este experimento se evaluó la toxicidad aguda de una solución de CV de 2,5mg/L y otra de CV 2,5mg/L+CIP 5mg/L que fueron irradiadas a distintas dosis. CV fue irradiada con 300, 500, 800, 1000, 1500 y 2000Gy y la mezcla con CIP se irradió con 1500Gy. Para todas las dosis en CV no se observó una tendencia en la longitud del hipocótilo. Todos oscilaron alrededor de un valor medio, por lo que las diferencias entre

unas y otras pudieron deberse a la simple dispersión de los datos. Por lo tanto, esta concentración de CV no causa toxicidad aguda para *L. sativa* y tampoco los posibles productos generados durante la irradiación.

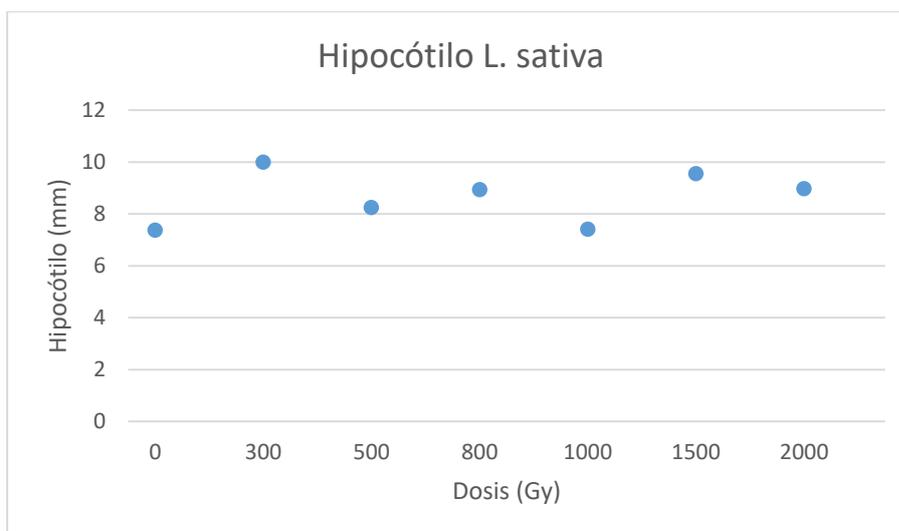


Figura 17: Largo de los hipocótilos de *L. sativa* dependiendo de la dosis.

Por otro lado, la mezcla de CV+CIP tampoco indicó que a esa concentración fueron tóxicos para *L. sativa*. No se pudo evidenciar un efecto de toxicidad aguda a causa de esto dos contaminantes en conjunto. En ambos casos, el promedio de los hipocótilos superaron los del control negativo.

	Germinación	Hipocótilo (mm)	Promedio (mm)
Control positivo	18	8,72	7,94
	19	7,16	
Control negativo	19	6,09	6,57
	19	7,05	
Dosis (Gy)			
0	16	9,06	7,38
	13	5,69	
300	16	8,31	9,99
	18	11,67	
500	17	10	8,25
	18	6,5	
800	18	7,5	8,94
	19	10,37	
1000	16	9,75	7,41
	14	5,07	
1500	16	9,63	9,55
	15	9,47	
2000	10	11,6	8,98
	17	6,35	
0 (CV+CIP)	17	6,76	8,41
	18	10,05	
1500 (CV+CIP)	17	10,58	9,32
	17	8,06	

Tabla 6: Datos del ensayo de toxicidad aguda con *L. sativa* para distintas soluciones y concentraciones.

En ninguno de los casos se presenció una disminución considerable del número de semillas germinadas. Además, una vez finalizado el ensayo, se detectaron tres tipos de hongos que crecieron alrededor de las semillas en varias de las placas de Petri, pudiendo haber afectado la normal germinación y por lo tanto el experimento. Otra de las variables que pudo haber arrojado estos resultados es la degradación del CV por efecto de la exposición a la luz, ya que este ensayo se incubó durante 5 días con luz continua.



Figura 18: Placas de Petri con semillas de *L. sativa* germinadas en distintas soluciones irradiadas a distintas dosis.

Respecto a los valores de los hipocótilos obtenidos en Tabla 6, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA). El p-valor para CV fue de 0,824 y el de CV+CIP fue de 0,391; ambos mayores a 0,05 lo cual indicó que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos.

Ensayo de toxicidad crónica

Chlorella vulgaris con CV

El ensayo con *C. vulgaris* de 72 horas se considera un ensayo crónico. En esta ocasión, se utilizaron las soluciones de CV irradiadas para poder determinar si las mismas son tóxicas para el alga en estas condiciones.

Primero, se evidenció el claro aumento del número de células viables a medida que aumentó las dosis, significando que la degradación del CV fue efectiva y que a su vez no se produjeron nuevas especies que induzcan toxicidad para *C. vulgaris*.

La manera correcta de expresar los resultados fue relacionándolos en todo momento con el control negativo para independizarse de valores absolutos.

$$\text{Valor relativo} = \frac{\text{Células viables (Cv)}}{\text{Células viables control negativo (Cn)}}$$

Por otro lado, los valores de células contadas al cabo de un día del ensayo fueron menores a los días subsiguientes. Esto pudo deberse a que a partir del segundo día los tubos fueron agitados con un vórtex, mientras que el día previo había sido manualmente. Esto permitió que las algas unicelulares entren en contacto con el medio de crecimiento BBM y favoreció un aumento en el número de células en cada

dosis a evaluar. Ya para las 72hs del ensayo el medio BBM se había consumido y el efecto de las dosis fue observado.

Tiempo (hs)	Promedio de células/ μ L			Células/células control (Cv/Cn)		
	24	48	72	24	48	72
Control positivo	850.000	775.000	612.500	-	-	-
Control negativo	912.500	912.500	1.125.000	1	1	1
Dosis (Gy)						
2000	917.000	825.000	775.000	1,00	0,90	0,69
800	533.000	817.000	592.000	0,58	0,90	0,53
300	416.000	742.000	617.000	0,46	0,81	0,55
0	317.000	650.000	608.000	0,35	0,71	0,54

Tabla 7: Células de *C. vulgaris* en suspensión de acuerdo a distintas dosis.

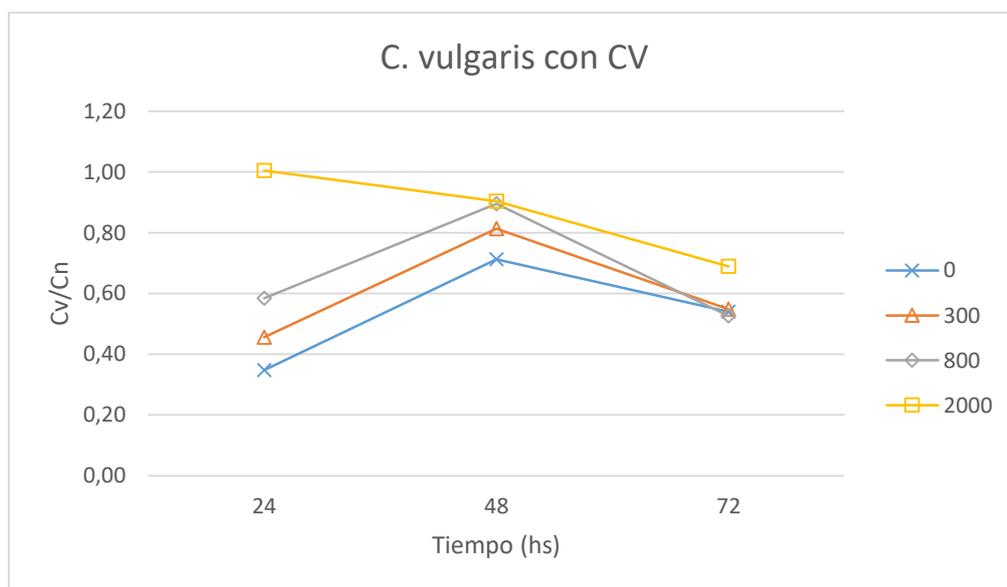


Figura 19: *C. vulgaris* en soluciones de CV irradiadas a distintas dosis.

De todas maneras, en el gráfico (Fig. 19) se observa claramente que a medida que aumento la dosis de irradiación, la toxicidad disminuye.

D. magna con CIP

Se colocaron 23 individuos controles, 50 en muestras no irradiadas de CIP de concentración de 5mg/L y 50 en muestras irradiadas a 1,5kGy de la misma solución que la anterior. A continuación en la siguiente tabla se detallan los resultados:

Tiempo (días)		Individuos control	Porcentaje (%)	Individuos 0Gy	Porcentaje (%)	Individuos 1,5kGy	Porcentaje (%)
0	Total de individuos	23	100	50	100	50	100
6	Vivas	23	100	41	82	26	52
	Descendencia	0	-	-	-	-	-
8	Vivas	23	100	24	48	1	2
	Descendencia	131	-	-	-	-	-
11	Vivas	22	95,65	2	4	0	0
	Descendencia	242	-	-	-	-	-
12	Vivas	21	91,3	0	0	0	0
	Descendencia	15	-	-	-	-	-
14	Vivas	21	91,3	0	0	0	0
	Descendencia	50	-	-	-	-	-
17	Vivas	21	91,3	0	0	0	0
	Descendencia	15	-	-	-	-	-
19	Vivas	21	91,3	0	0	0	0
	Descendencia	14	-	-	-	-	-
21	Vivas	21	91,3	0	0	0	0
	Descendencia	14	-	-	-	-	-

Tabla 8: Porcentaje de individuos vivos en ensayo crónico de *D. magna* con CIP 5mg/L a distintas dosis.

Los únicos individuos que tuvieron descendencia fueron los del control. Éstos se mantuvieron en condiciones de crecimiento favorables, lo que permitió que crecieran y se reproduzcan de manera normal. El total de neonatos durante el ensayo fue de 481. Por más que dos de los controle hayan muerto, el ensayo se consideró válido con un 10% de tolerancia de mortalidad.

La solución sin irradiar produjo una disminución de organismos viables, culminando con la totalidad de muertes para el día 11. La solución irradiada mostró una abrupta caída de la población respecto a la inicial al cabo de pocos días, incluso con una tendencia más pronunciada que la que no fue irradiada. Esto sugiere la aparición de una o varias sustancias producto de la degradación de la CIP a causa de las especies producidas por la radiólisis del agua durante la irradiación.

Además los tamaños de las *Daphnias* fueron considerablemente menores en tamaño a las del control, sugiriendo que los medios con el antibiótico irradiado o no, inhiben de cierta manera su normal crecimiento.

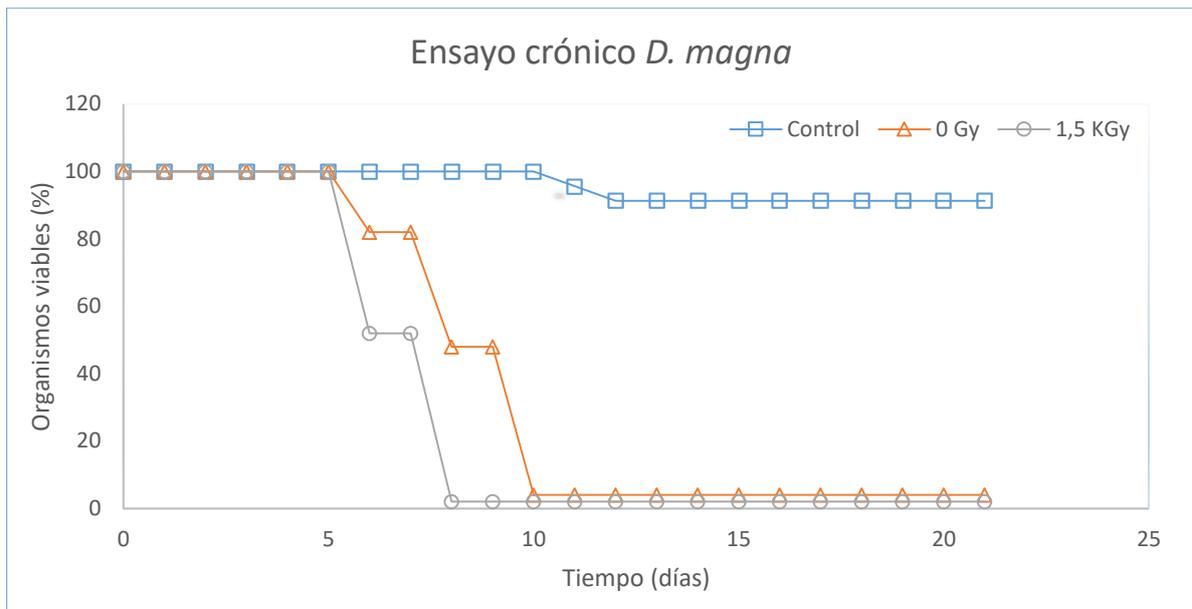


Figura 20: Ensayo crónico de *D.magna* con CIP 5mg/L a distintas dosis

Capítulo 7

Evaluación de la calidad de agua

DBO₅

En todos los casos se decidió utilizar 2,00mL de simiente que fue preparado 48 horas antes con agua del Arroyo Aguirre y heces de perro. Según ensayos que realizamos previamente, ese era el volumen óptimo el cual la DBO₅ de la calibración de glucosa/glutamato daba cercano a los valores que la norma establece ($198 \pm 30,5$ mg/L). El volumen del estándar en el caso correspondiente fue de 6mL.

Se estudiaron cinco dosis de CV de concentración 2,5mg/L. Por una cuestión de volúmenes disponibles, se decidió colocar sólo la solución y el simiente en los casos de 500, 1500 y 2000Gy, mientras que se diluyó a la mitad el de 0 y 2000Gy con agua de dilución y luego se le colocó el simiente. En todos los casos se armaron duplicados, aunque en la tabla se detallan únicamente los promedios.



Figura 21: Frascos de Winkler con las distintas soluciones para determinar su DBO.

Fue sumamente importante mantener la temperatura controlada en todo el ensayo, no sólo durante la incubación, sino también en la medición del OD, del cual depende fuertemente. El agua de dilución preparada con agua destilada hubo que airearla con agitación mecánica para que llegara a los valores aceptables de OD iniciales (7,03-7,64mg/L). Una vez concluidas las mediciones, se continuó con los cálculos correspondientes.

	Volumen Muestra (mL)	Volumen final (mL)	Volumen Simiente (mL)	Volumen estándar (mL)	OD inicial (mg/L)	T inicial(°C)	OD final (mg/L)	T final (°C)
Blanco	-	300	-	-	7,64	20,4	6,40	20,9
Simiente	-	300	2	-	7,42	20,5	3,40	19,4
Gluc/Glut	-	300	2	6	7,60	20,3	0,86	20,1
0Gy	150	300	2	-	7,44	19,7	2,92	21,3
500Gy	300	300	2	-	7,05	21,1	0,53	21,9
1000Gy	300	300	2	-	7,47	20,8	4,64	19,2
1500Gy	300	300	2	-	7,03	20,6	3,72	22,2
2000Gy	150	300	2	-	7,42	20,0	2,22	20,9

Tabla 9: Características del armado de las soluciones de CV y sus características.

El blanco teóricamente sólo poseía agua de dilución sin materia orgánica y arrojó una diferencia de OD de 1,24mg/L. Esto no es lo más recomendable, porque es indicativo de que el agua que se utilizó no es de buena calidad. Los valores debieron oscilar entre 0 y 0,2mg/L (Young, 2015). Algunas de estas causas podrían haber sido arrastre de compuestos orgánicos volátiles y material de vidrio no debidamente limpio y se sugiere la limpieza con solución sulfocrómica y esterilización.

Por otro lado, puede observarse que la DBO₅ de las distintas muestras no presentaron grande diferencias y todos fueron valore bastante bajos. Esto pudo deberse a que como la degradación se hace por parte de microorganismos presentes en el simiente y el CV no es biodegradable, éstos no fueron capaces de eliminarlo completamente. De hecho, una vez finalizado el ensayo los frascos de Winkler continuaban del mismo color violeta con el cual habían sido incubados los días previos.

	ODi-ODf	S (mg/L ₂)	Seed depletion S.Vs (mg/L)	Fracción de estándar o muestra (P)	$DBO_5 = \{(ODi-ODf) - S.Vs\} / P$ (mg/L)
Blanco	1,24	-	-	-	-
Simiente	4,02	2,01	4,02	-	-
Gluc/Glut	6,74	2,01	4,02	0,02	136,00
0Gy	4,52	2,01	4,02	0,5	1,00
500Gy	6,52	2,01	4,02	1	2,50
1000Gy	2,83	2,01	4,02	1	-1,19
1500Gy	3,31	2,01	4,02	1	-0,71
2000Gy	5,20	2,01	4,02	0,5	2,36

Tabla 10: Cálculos y resultado de DBO para CV de 2,5mg/L irradiadas a distintas dosis.

Los resultados que dieron negativo (1000 y 1500Gy) nos indicó la presencia de materia orgánica en los frascos, como así los microorganismos que fueron agregados a las muestras, consumiendo mayor cantidad de oxígeno durante la incubación.

Por último, es importante concluir que la información que arroja la DBO₅ para efluentes con estas características es sólo acerca de su biodegradabilidad, pero no es dependiente de dosis (y consecuentemente su concentración). De todas maneras, este ensayo debería volver a repetirse y asegurar la correcta limpieza de los frascos, para eliminar cualquier residuo de materia orgánica de ensayos previos y evaluar si la calidad del agua es óptima para realizar estos ensayos.

DQO

En la siguiente figura se presenta la curva de calibración para los viales de DQO, y que permitió relacionar la Abs (420nm) con la DQO (mgO₂/l):

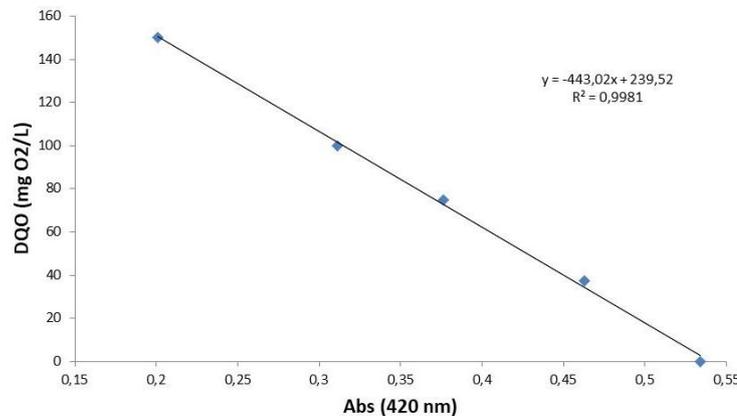


Figura 22: Calibración de DQO con estándares de ftalato.

Se obtuvo una regresión lineal con pendiente negativa. La ecuación correspondiente es:

$$DQO = -443,02 \text{ mg/L} \times Abs + 239,52 \text{ mg/L}; R^2 = 0,9981 \text{ (Vogt, 2017)}$$

El análisis se realizó sobre muestras de CV de una concentración de 2,5mg/L, sin irradiar e irradiada con dosis de 300, 800 y 2000Gy, siendo los valores medidos y calculados por la ecuación como se muestra a continuación:

Dosis (Gy)	Absorbancia	DQO (mg/L)
0	0,1376	178,6
300	0,1440	175,7
800	0,1552	170,8
2000	0,1711	163,7

Tabla 11: DQO calculado a partir de la medición de absorbancia a 420nm.

De los resultados obtenidos, se pudo observar que no hubo diferencia significativa entre las distintas DQO a las diferentes dosis. Todos oscilaron entre valores de 178,6 y 163,7mg/L. Esto pudo deberse a que, incluso cuando las moléculas de CV ya no se encontraban como tal en la solución (corroborado por espectrofotometría UV-VIS), el compuesto pudo haberse transformado a otro que no absorbiera a esas longitudes de onda. De todas maneras, no se logró la completa mineralización que sería la degradación a $\text{CO}_{2(g)}$ y H_2O .

Aun así, hay una leve disminución de la DQO a medida que se incrementa la dosis. Esto puede darse a que una fracción (no muy considerable) sí se transformó a carbono inorgánico durante el proceso de irradiación.

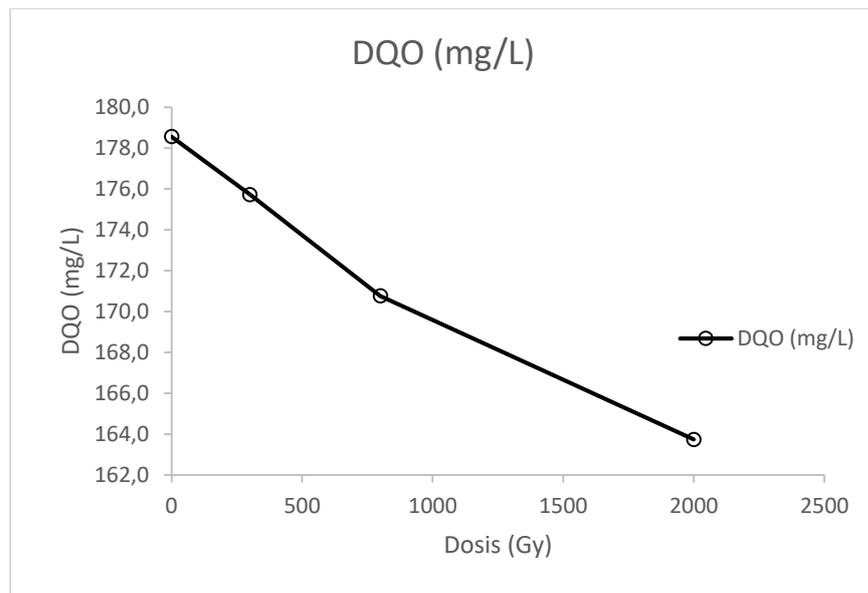


Figura 23: DQO en función de las dosis aplicadas a las soluciones de CV

Conclusiones

En este trabajo se logró ensayar con dos contaminantes ambientales conocidos el fármaco ciprofloxacina y el colorante cristal violeta. Los efluentes reales generalmente tienen concentraciones mucho menores (en el orden de los $\mu\text{g/L}$) de dichos contaminantes, por lo que las dosis utilizadas durante este trabajo serían adecuadas para su tratamiento y utilizar la irradiación gamma como método alternativo. Por otro lado, cabe destacar que los ensayos se focalizaron en las moléculas nombradas, pero no se verificó que no se hayan generado otras especies que ocasionen toxicidad en otro tipo de organismos e incluso afecte la salud humana. Para ello debería continuarse los estudios utilizando equipos (GC-MS, HPLC, entre otros) que permitan identificar todos los productos de degradación química que sufre el compuesto cuando es sometido a irradiación, cuantificarlo y realizar los respectivos ensayos toxicológicos utilizando varios de modelos biológicos de distintas características y escalas evolutivas.

Cuando se utilizó la CIP en concentraciones de 5mg/L se observó que las radiaciones ionizantes, no favorecen la reducción de la toxicidad al contrario la intensifican y generarían sustancias más tóxicas. Posiblemente se podría usar como método complementario a los métodos tradicionales, pero esto se debería probar en investigaciones futuras. Por otro lado, cuando se analizó CIP 100mg/L se utilizaron dosis de irradiación alta, entre 3kGy y 12kGy, estas dosis provocaron la formación de sustancias que colorearon la solución, lo que representa una desventaja para el tratamiento de este compuesto, ya que la decoloración es uno de los objetivos principales. Esto no quiere decir que quizá utilizando dosis mayores a las ya probadas esto no se pueda solucionar, pero es una buena alternativa para continuar investigando. En este caso se debería analizar cuál es la especie que genera esa coloración, mediante el uso de equipos previamente mencionados y realizar ensayos combinados para eliminar el tóxico en cuestión.

Con el pigmento CV, la radiación elimina el color violeta intenso y eso es muy ventajoso, ya que una de las características más indeseadas de este compuesto es su capacidad de colorear grandes volúmenes de agua, incluso en concentraciones muy bajas. Respecto a los ensayos toxicológicos, 2,5mg/L de CV resultó ser muy tóxico para *D. magna* y utilizando dosis de 2000Gy se observa 95% de la reducción de la toxicidad con respecto a la solución original sin irradiar. Cuando se utilizó *C. vulgaris* como modelo biológico, se observa que a dosis creciente de radiación (0, 300, 800 y 2000Gy) la toxicidad se redujo notablemente.

Cuando se usó *L. sativa* como modelo biológico, no arrojó grandes resultados, puesto que no se generó inhibición de la longitud del hipocótilo y tampoco no se vio afectada la germinación respecto al control. Por lo que se concluye que en estas condiciones, el CV no resulta tóxico para *L. sativa*. En este caso se puede sugerir realizar un ensayo crónico, para ver si a lo largo del ensayo no existen efectos fitotóxicos en las muestra sin irradiar que en el ensayo agudo no se alcanzó a visualizar y además se podría realizar el ensayo en completa oscuridad para evitar descartar una posible fotodegradación del CV.

En referencia a la calidad del agua, la DQO determinó que el CV aumenta la demanda de oxígeno del efluente por ser una molécula orgánica capaz de oxidarse por completo por métodos químicos. Así y todo, a medida que la dosis fue mayor la DQO disminuyó levemente, pero de todos modos no logró degradarse completamente quedando especies remanentes en la solución.

La DBO₅ no arrojó resultados similares a DQO, de hecho fueron mucho menores, debido a que CV no es biodegradable por microorganismos presentes en el simiente utilizado. Se puede decir por tanto que la DBO₅ representa la cantidad de materia orgánica biodegradable y la DQO representa tanto la materia orgánica biodegradable como la no biodegradable. Más allá de eso, quizás haya una variación de las dosis de irradiación con respecto a la muestra no irradiada, para ello se puede sugerir realizar el ensayo de DBO₅ nuevamente, ya que este ensayo no fue válido porque los controles no dieron los valores establecidos por la norma, además se debería verificar la calidad del agua con la cual se realiza el ensayo y limpiar los frascos winkler para evitar restos de materia orgánica provenientes de ensayos previos.

Como conclusión final podemos asegurar que con una dosis de 2000Gy, la radiación gamma reduce la toxicidad del CV para una concentración de 2,5mg/L en microcrustáceos *Daphnia Magna*, También se observó que para esa misma dosis, se redujo la toxicidad en un alga unicelular *Chlorella vulgaris*. En este caso la radiación gamma podría ser un tratamiento alternativo muy eficaz.

Respecto a CIP a una concentración de 5mg/L y a una dosis de hasta 1500Gy, la radiación gamma no reduce su toxicidad sino aumenta para *Daphnia magna* y además colorea la solución. Esto no implica que esta tecnología quede descartada, sino que se sugiere mayor investigación en esta temática para poder complementar a los tratamientos convencionales.

Bibliografía

- APHA. (1998). *Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater*.
- APHA5210D. (n.d.). Norma OECD APHA 5120D.
- Castillo, G. (2004, 1° edición). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua*.
- Faiza, R. (2017). Removal of crystal violet dye from aqueous solution by gamma radiation.
- Hach. (2014, 10). *Chemical Oxygen Demand*.
- Harris, D. (2004). *Análisis Químico Cuantitativo 2° Edición*. Reverte.
- Iannacone J., A. L. (2009). Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphna magna*. *Ecología Aplicada*, 8(2).
- IRAM, N. (2015). *Práctica para el uso del sistema dosimétrico alanina - EPR*.
- ISO8292. (2015). *Water quality- fresh water algal growth inhibition tet with unicellular green algae*.
- Juárez, J. (2010). Toxicidad aguda y crónica del lindano sobre *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera Daphniidae).
- López-Peñalver, J. (2010). Radiolisis. Una alternativa a los tratamientos convencionales de aguas urbanas y residuales.
- Martins, N. (2012). Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk.
- Mella, S. (2000). *Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación*.
- Murtaza, S. (2015). *Degradation of Ciprofloxacin in water by Advanced Oxidation Process: Kinetics Study, Influencing Parameters and Degradation Pathways*.
- Papadópulos, C. (1970). *La Plata de Irradiación Semi-Industrial de Ezeiza*.
- Riaño, P. (2018). Degradación del Cristal Violeta presente en aguas residuales mediante la oxidación catalítica húmeda con peróxidos de hidrógeno (CWPO) a partir de óxidos mixtos de Mn-Cu a condiciones moderadas.
- UNESCO. (2017). *Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos. Aguas residuales: el recurso no explotado*.
- Villamizar, P. (2008). *Análisis de métodos analíticos usados para el análisis del agua, en el Laboratorio del centro de Estudios e Investigaciones Ambientales*.
- Vogt, V. (2017). *Tratamiento de residuos industriales por radiación*.
- Young, J. C. (2015). *Changes in the Biochemical Oxygen Demand procedure in the 21st Edition of Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater*.