

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA AGRÍCOLA



TESIS

EFECTO TOXICOLÓGICO DEL TRICLOSÁN SOBRE *Daphnia pulex* (PULGA DE AGUA) Y *Lactuca sativa* (LECHUGA) MEDIANTE BIOENSAYOS.

PRESENTADA POR:

EDGAR ARMANDO APAZA AGUILAR

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAGISTER SCIENTIAE EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PUNO, PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA AGRÍCOLA



TESIS

EFFECTO TOXICOLÓGICO DEL TRICLOSÁN SOBRE *Daphnia pulex* (PULGA DE AGUA) Y *Lactuca sativa* (LECHUGA) MEDIANTE BIOENSAYOS.

PRESENTADA POR:

EDGAR ARMANDO APAZA AGUILAR

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAGISTER SCIENTIAE EN INGENIERÍA AMBIENTAL

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

PRESIDENTE:

.....
Dr. EDILBERTO VELARDE COAQUIRA

PRIMER MIEMBRO:

.....
M.Sc. LORENZO GABRIEL CIEZA CORONEL

SEGUNDO MIEMBRO:

.....
M.Sc. ROBERTO ALFARO ALEJO

ASESOR DE TESIS:

.....
Dr. JUAN JOSE PAURO ROQUE

Puno, 21 de diciembre del 2018

ÁREA: Ingeniería Ambiental.
TEMA: Efecto toxicológico del triclosán.
LÍNEA: Control de la contaminación del agua.

DEDICATORIA

Quiero dedicar éste trabajo de investigación a mis padres Victor y Salomina, por haberme formado y orientado hacia la vida profesional y mis hermanas y hermanos; Esther, Lia, Candelaria, Hugo, Julio, Jesús y Edith por brindarme todo su apoyo moral para la culminación de mis estudios de posgrado.

También dedico el estudio a mí querida esposa Yovana, a mis hermosos hijos Rodrigo, Andres y Leandro por su comprensión, entusiasmo y apoyo a lo largo de todo este tiempo de estudios y que ahora culmina con la obtención de este grado académico.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater la Universidad Nacional del Altiplano de Puno,
en especial a la plana docente de la Maestría en Ingeniería
Ambiental, por haberme formado e inculcado sabias enseñanzas
para desarrollarme en un campo de tanta importancia como es el
ambiente en que vivimos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Marco teórico	3
1.1.1. El triclosán	3
1.1.2. Organismos de prueba en bioensayos	4
1.1.3. Toxicidad	6
1.1.4. Concentración letal media (CL ₅₀)	6
1.1.5. Efecto adverso no observable	7
1.1.6. Ensayos toxicológicos.....	7
1.1.7. Bioensayos en <i>Lactuca sativa</i>	7
1.1.8. Bioensayos en pulga de agua <i>Daphnia pulex</i>	8
1.2. Antecedentes	8

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Definición del problema.....	14
2.2. Planteamiento del problema.....	15
2.3. Justificación.....	16

2.4.	Objetivos de la investigación	17
2.5.	Hipótesis de la investigación.....	17

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.	Lugar de estudio.....	18
3.2.	Población y tamaño de muestra.....	18
3.3.	Métodos.....	18
3.3.1.	Concentración letal media (CL ₅₀) del triclosán sobre <i>Daphnia pulex</i> mediante bioensayo.	18
3.3.2.	Concentración letal media (CL ₅₀) del triclosán sobre <i>Lactuca sativa</i> mediante bioensayos.....	20
3.3.3.	Concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre <i>Daphnia pulex</i> y <i>Lactuca sativa</i>	22

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Concentración letal media (CL ₅₀) del triclosán sobre “pulga de agua” (<i>Daphnia pulex</i>) analizada mediante bioensayo.....	24
4.1.1.	A las 6 horas de exposición	24
4.1.2.	A las 12 horas de exposición	26
4.1.3.	A las 18 horas de exposición	27
4.2.	Concentración de inhibición media (CL ₅₀) del triclosán sobre “lechuga” (<i>Lactuca sativa</i>) analizada mediante bioensayo.....	33
4.2.1.	A los 3 días de exposición	33
4.2.2.	A los 5 días de exposición	34
4.2.3.	A los 7 días de exposición	35
4.3.	Concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre “pulga de agua” (<i>Daphnia pulex</i>) y “lechuga” (<i>Lactuca sativa</i>) analizada mediante bioensayo.....	39

4.3.1. Concentración sin efecto adverso observable (NOAC) de triclosán sobre <i>Daphnia pulex</i>	39
4.3.2. Concentración sin efecto adverso observable (NOAC) de triclosán sobre <i>Lactuca sativa</i>	40
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Parámetros fisicoquímicos de las concentraciones de triclosán utilizadas en el estudio	24
2. Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 6 horas de exposición.....	25
3. Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 12 horas de exposición.....	26
4. Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición.....	28
5. Análisis de varianza del modelo sigmoide para mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición.....	29
6. Análisis de varianza para mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición	30
7. Longitud total de plántula (cm) en semillas de lechuga sometidas a concentraciones de triclosán a los 3 días de exposición	33
8. Longitud total de plántula (cm) en semillas de lechuga sometidas a concentraciones de triclosán a los 5 días de exposición	34
9. Longitud total de plántula (cm) en semillas de lechuga sometidas a concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición	35
10. Análisis de varianza para crecimiento total de raíz de <i>L. sativa</i> sometidas a concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición	38
11. Determinación de la concentración sin efecto adverso observable (NOAC) sobre <i>Daphnia pulex</i> sometidas a concentraciones de triclosán.....	39
12. Determinación de la concentración sin efecto adverso observable (NOAC) sobre <i>Lactuca sativa</i> sometida a concentraciones de triclosán	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Mortalidad (%) de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 6 horas de exposición.....	25
2. Mortalidad (%) de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 12 horas de exposición.....	27
3. Mortalidad (%) de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición.....	28
4. Modelo sigmoide para probabilidad de mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición	30
5. Inhibición porcentual de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 3 días de exposición.....	34
6. Inhibición porcentual de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 5 días de exposición.....	35
7. Inhibición porcentual de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición.....	36
8. Concentración de Inhibición media (CL ₅₀) de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición	37
9. Procedimiento de ejecución del bioensayo con <i>Daphnia pulex</i>	58
10. Procedimiento de ejecución del bioensayo con <i>Lactuca sativa</i>	59
11. Efecto de concentraciones de triclosán versus tratamiento control en el desarrollo de plántulas de lechuga.....	60

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Constancia de realización del estudio en Laboratorio de Inculaya, Chucuito	49
2. Constancia de ejecución del estudio en el laboratorio de Ecología Acuática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno.	50
3. Resultados del bioensayo de toxicidad de triclosán sobre <i>Daphnia pulex</i>	51
4. Resultados del bioensayo de toxicidad de triclosán sobre <i>Lactuca sativa</i>	52
5. Resultados de modelo sigmoide con transformación Probit para el ensayo de toxicidad de triclosán sobre <i>Daphnia pulex</i>	53
6. Resultados de análisis estadístico	54
7. Panel fotográfico.....	58

RESUMEN

El triclosán es un producto químico antibacteriano y fungicida, actualmente es considerado como un contaminante emergente por su amplio uso en diferentes productos de limpieza personal (jabones, geles, pastas dentales, etc.) y por su persistencia en el ambiente acuático aún luego del tratamiento de aguas servidas domésticas. El objetivo del estudio fue determinar el efecto toxicológico del triclosán sobre *Daphnia pulex* (pulga de agua) y *Lactuca sativa* (lechuga) mediante bioensayos. El estudio fue experimental conducido bajo un diseño en bloque completamente al azar (DBCA) en dos bioensayos, se utilizaron seis concentraciones de triclosán y tres tiempos de exposición, la evaluación de toxicidad aguda fue sobre un organismo animal y otro vegetal, la variable de respuesta fue la mortalidad y crecimiento de plántulas respectivamente, para los cálculos de concentración letal media (CL_{50}) se utilizó análisis de regresión no lineal y prueba de rango múltiple. Los resultados fueron: la concentración letal media (CL_{50}) del triclosán sobre *Daphnia pulex* (pulga de agua) analizada mediante bioensayo, fue estimada en $0.17938 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán, el intervalo inferior al 95% de confianza es de $0.06036 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y el intervalo superior de $0.28704 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. La concentración de inhibición media (CL_{50}) del triclosán sobre plántulas de *Lactuca sativa* (lechuga), fue estimada en $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán. La concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre *Daphnia pulex* (pulga de agua) fue estimada en $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, y para *Lactuca sativa* (lechuga) fue estimada en $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán. Se concluye que el triclosán muestra un efecto toxicológico sobre un organismo animal y otro vegetal, provocando mortalidad en el primero e inhibiendo el crecimiento en el segundo.

Palabras clave: Bioensayos, *Daphnia pulex*, *Lactuca sativa*, toxicidad y triclosán.

ABSTRACT

Triclosán is an antibacterial and fungicidal chemical, currently considered an emerging contaminant due to its wide use in different personal cleansing products (soaps, gels, toothpastes, etc.) and for its persistence in the aquatic environment even after treatment of domestic wastewater. The objective of the study was to determine the toxicological effect of triclosán on *Daphnia pulex* (water flea) and *Lactuca sativa* (lettuce) by bioassays. The study was conducted experimentally under a completely random block design (DBCA) in two bioassays, six concentrations of triclosán and three times of exposure were used, the acute toxicity evaluation was on an animal organism and another vegetable, the response variable was the mortality and growth of seedlings respectively, for the calculations of mean lethal concentration (LC_{50}) used non-linear regression analysis and multiple-range test. The results were: the mean lethal concentration (LC_{50}) of triclosán on *Daphnia pulex* (water flea) analyzed by bioassay, was estimated at $0.17938 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ triclosán, the interval lower than 95% confidence is $0.06036 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ and the upper interval of $0.28704 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. The mean inhibition concentration (LC_{50}) of triclosán on seedlings of *Lactuca sativa* (lettuce), was estimated at $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ of triclosán. The concentration with unobservable adverse effect (NOAC) of triclosán on *Daphnia pulex* (water flea) was estimated at $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, and for *Lactuca sativa* (lettuce) it was estimated at $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ triclosán. It is concluded that triclosán shows a toxicological effect on an animal organism and another vegetable, causing mortality in the first and inhibiting growth in the second.

Key words: Bioassays, *Daphnia pulex*, *Lactuca sativa*, toxicity and triclosán.

INTRODUCCIÓN

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), en el año 2016 emitió un comunicado, en el que dió a conocer que no se podrán comercializar jabones antibacteriales y geles de baño de venta libre que contengan diecinueve ingredientes, entre los que se incluye el triclosán y triclocarbán; esto debido a que los fabricantes no han presentado información que demuestre que su uso a largo plazo fuera más seguro y eficaz que el uso del jabón tradicional frente a la prevención y la propagación de ciertas enfermedades (Ministerio de Salud, 2017).

Sin embargo el Perú por pertenecer a la Comunidad Andina de Naciones (CAN), todos los productos cosméticos se encuentran regulados por normas supranacionales, por lo que con la información disponible a la fecha, los países andinos inician consultas para evaluar el uso de los ingredientes triclosán y triclocarbán en base a pruebas científicas, analizar la información disponible y tomar una decisión, por lo que la situación actual en el país es el de realizar investigaciones que aporten pruebas efectivas respecto al efecto antibacteriano del triclosán, pero adicionalmente evaluar su toxicidad y efectos negativos a organismos vivos de los ambientes naturales a los cuales son vertidas aguas servidas con esta sustancia (Ministerio de Salud, 2017).

Por lo que el presente estudio busca contribuir con la evaluación de este contaminante emergente (Triclosán), mediante ensayos de toxicidad aguda utilizando organismos vivos (bioensayos), un organismo animal y otro vegetal ya utilizados en estudios de toxicidad, los resultados permitirán establecer cuál es la toxicidad de esta sustancia, determinando la concentración letal media para los dos organismos de prueba, así mismo permitirá determinar cuál es la concentración sin efecto adverso, contribuyendo con información científica que permita tomar decisiones sobre el uso del triclosán y los efectos del mismo en organismos vivos.

La utilización de organismos vivos en los ensayos de toxicidad, responde a una observación más directa sobre el efecto que tendrían los efluentes contaminantes sobre los cuerpos de agua receptores, de forma tal que se pueda estimar parámetros de importancia como la concentración letal media de sustancias tóxicas (CL_{50}), así como la concentración sin efecto adverso observable (NOAC). Los ensayos de toxicidad se llevan a cabo con componentes vegetales como son las semillas de lechuga y en organismos vivos propios del ecosistema acuáticos como es la pulga de agua, en el presente estudio

utilizamos las semillas de lechuga para evaluar el efecto inhibitorio que produce una sustancia tóxica como el triclosán sobre dos partes de la semilla (radícula e hipocotilo), mientras que para la pulga de agua se estudia el efecto tóxico de la misma sustancia expresado en la mortalidad producida por el mismo (US EPA, 2002).

En otros países se ha evidenciado los problemas de toxicidad del triclosán en organismos acuáticos (Europa), sin embargo en nuestro medio su efecto tóxico sobre organismos vivos no ha sido estudiado a profundidad, por lo que el presente estudio presenta resultados inéditos y actualizados del efecto de esta sustancia sobre dos organismos vivos, llegando a conclusiones sobre el efecto tóxico así como determinación de los principales parámetros del mismo, como son la concentración letal media, efecto inhibitorio y concentración sin efecto adverso (Singer, 2002).

El presente documento de investigación, inicia con una introducción del tema de estudio, en el Capítulo I realizamos una revisión exhaustiva de la literatura relevante sobre el tema y los antecedentes del mismo; en el Capítulo II se muestra el planteamiento del problema, de cuya percepción inicial inició el proceso investigativo; en el Capítulo III presentamos los materiales y métodos utilizados en el desarrollo del estudio, especificando el lugar de estudio, población, muestra, métodos y su descripción para cada objetivo específico de la investigación; en el Capítulo IV exponemos los resultados y discusión, presentándolos en tablas y figuras, realizando una descripción de los mismos y su respectivo análisis estadístico, posteriormente se realiza la discusión de los mismos, en relación con la literatura revisada; finalmente se presenta las conclusiones derivadas de los resultados, las recomendaciones pertinentes y la bibliografía utilizada, en los anexos se encuentran información adicional y figuras de la evidencia de la realización del estudio.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Marco teórico

1.1.1. El triclosán

El triclosán es un compuesto que se añade como conservante o como un agente antiséptico en una variedad de productos de consumo de uso diario, tales como jabones de manos, cremas, desodorantes, productos farmacéuticos, pastas de dientes, limpiadores domésticos e incluso textiles y como un agente estabilizante en una multitud de detergentes y cosméticos (Singer *et al.*, 2002).

Se trata de un compuesto aromático clorado con grupos funcionales éter y fenol, hidrolíticamente estable y poco volátil, con una elevada hidrofobicidad (Pérez, Fernández, Peropadre, & Hazen, 2014). La concentración de este compuesto en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales ha sido establecida en un rango de 0.027 a 2.7 mg·ml⁻¹, siendo 2.3 mg·ml⁻¹ la cantidad máxima detectada en los ríos (Chalew & Halden, 2009).

El triclosán actúa inhibiendo la ruta de biosíntesis de ácidos grasos bacteriana mediante su unión a una enzima presente en esta ruta, una enoil-reductasa dependiente de NADH (Heath *et al.*, 1999). La determinación de la estructura cristalina del complejo FabI-NADH-Triclosán de *E. coli*, confirmó que el triclosán forma un complejo ternario estable mediante la interacción con residuos aminoácidos del sitio activo de la enzima. Así, el triclosán actúa como un inhibidor dirigido al sitio activo de la enoil-reductasa dependiente de NADH, imitando su sustrato natural. Sin embargo, el triclosán es un agente antimicrobiano de amplio espectro y como tal, podría afectar, además de los organismos objetivo, a otros organismos del medio fluvial (Wilson *et al.*, 2003).

Por último, también es importante tener en cuenta que hay una multitud de factores que influyen en las concentraciones de triclosán en los sistemas acuáticos, incluyendo las características de las aguas como son el pH, la densidad o el contenido en materia orgánica, e incluso la estación y la intensidad de la luz solar (Molina, 2014).

1.1.2. Organismos de prueba en bioensayos

a. *Daphnia pulex*

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. 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 (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. El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladócera de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual se cuenta con 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 *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, agua de pozo y sedimentos, entre otros (US EPA, 2002).

En las pruebas de toxicidad con *Daphnia*, neonatos menores de 24 h de edad son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un periodo de 48 h, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida.

b. *Lactuca sativa*

El bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* es una prueba estática de toxicidad aguda (96 horas de exposición), en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. 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 y del hipocotilo. 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 (Sobrero & Ronco, 2004).

La evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación, Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Sobrero & Ronco, 2004).

Para la realización de estos bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos en el proceso ya que no requiere de equipo sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reúso de biosólidos (Sobrero & Ronco, 2004).

1.1.3. Toxicidad

Se define toxicidad como los efectos adversos que causan en un organismo los contaminantes, generalmente un veneno o la mezcla de venenos. La toxicidad es el resultante de la concentración y del tiempo de exposición, modificado por variables como la temperatura, formas químicas y disponibilidad (APHA, 1992).

a. La toxicidad crónica

Es causada por dosis muy bajas de un compuesto o de un efluente tóxico sobre un período de tiempo largo y puede ser mortal o sub-letal (no suficiente para causar la muerte). Los efectos sub-letales pueden ocurrir en el nivel bioquímico, fisiológico o del comportamiento, incluyendo mutagenicidad y genotoxicidad e interferencia con el ciclo vital normal de un organismo. Hay actualmente gran interés en los métodos para detectar toxicidad sub-letal como medios de la detección temprana para el daño ambiental (Nuñez *et al.*, 2005).

b. La toxicidad aguda

Es causada generalmente por la exposición a una dosis grande de un compuesto tóxico por un período de tiempo corto. Un efecto rápido se produce en los organismos, generalmente muerte, y esto se puede utilizar para determinar la concentración mortal de un excedente del compuesto o del efluente al período del tiempo dado (Nuñez *et al.*, 2005).

1.1.4. Concentración letal media (CL₅₀)

Concentración de tóxico que produce la muerte del organismo, generalmente conocida como la concentración letal de la mediana (50 por 100) es decir la concentración que mata al 50% de los seres expuestos durante un tiempo de exposición específico. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como CL₅₀ por concentración letal media, CL₅₀ por concentración efectiva media y LTM por (límite de tolerancia media). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas CL₅₀, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo (US EPA, 2002).

1.1.5. Efecto adverso no observable

Indica el nivel de exposición a una sustancia (concentración), la cual no produce la mortalidad o algún efecto observable sobre el organismo de prueba, observado en un experimento de toxicidad, por lo general este valor o concentración es determinado mediante pruebas estadísticas comparativas con la contrastación de un tratamiento control (sin sustancia tóxica), se puede considerar aquella cantidad del contaminante inocua para el organismos de prueba (US EPA, 2002).

1.1.6. Ensayos toxicológicos

Los ensayos de toxicidad son los ensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa, bajo condiciones experimentales específicas y controladas estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la relación de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Núñez & Hurtado, 2005).

1.1.7. Bioensayos en *Lactuca sativa*.

La lechuga o *Lactuca sativa* es una planta con raíz pivotante y ramificada de unos 25 cm. El crecimiento se desarrolla en roseta; las hojas se disponen alrededor de un tallo central, corto y cilíndrico que gradualmente se va alargando para producir las inflorescencias, formadas por capítulos de color amarillo reunidos en corimbos (Sobrero & Ronco, 2004).

Se emplea *Lactuca sativa* como organismo de prueba para caracterizar el impacto de efluentes sobre el nivel trófico de las macrófitas y otras plantas tanto terrestres como acuáticas para complementar los análisis ambientales, ya que los resultados se basan en la sensibilidad de las plantas cuando se exponen a muestras de suelo o sedimento, agua (aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales) (Sobrero & Ronco, 2004).

1.1.8. Bioensayos en pulga de agua *Daphnia pulex*

La pulga de agua o *Daphnia pulex* es un pequeño crustáceo cladócer. Vive en lagos y lagunas alimentándose principalmente de algas, es un organismo planctónico altamente sensible y sirviendo, a su vez, de alimento a los peces, así que una alteración en el ecosistema o un efecto en ellos afectará los demás eslabones de la cadena trófica. Es un componente importante de las comunidades acuáticas y es sensible a un amplio rango de contaminantes. Su uso se encuentra estandarizado en numerosos protocolos y recomendado en las normas legislativas europeas y españolas, para la evaluación eco-toxicología de vertidos y residuos industriales y urbanos (Núñez & Hurtado, 2005).

Daphnia pulex es el organismo ideal debido a que para estudiar los efectos de efluentes sobre los cuerpos de agua, es preciso seleccionar especies representativas del área de desembocadura, especialmente especies cultivables en el laboratorio y cuyos métodos de evaluación hayan sido estandarizados.

1.2. Antecedentes

a. A nivel global

Amdany *et al.* (2014), evaluaron la presencia en aguas residuales de dos fármacos antiinflamatorios no esteroideos y un producto para el cuidado personal, el triclosán, en el afluente y efluente de Goudkoppies y Northern Wastewater Treatment Plants en Sudáfrica. La exposición se realizó durante 14 días en 2012. Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución con detectores de ultravioleta y fluorescencia para analizar los extractos de POCIS. Los resultados estaban entre 0.087 y 0.383 $\ell \cdot d^{-1}$ en condiciones de reposo, y 0.125 y 0.936 $\ell \cdot d^{-1}$ en condiciones de agitación. De las cantidades acumuladas en muestreadores desplegados en campo, las concentraciones estimadas libremente disueltas de los compuestos estudiados en el afluente de aguas residuales variaron de 55.0 a 78.4 μg , respectivamente. Las concentraciones promedio de estos compuestos en el efluente tratado variaron de 10.7 a 13.5 μg , y de 20.4 a 24.6 μg en la PTAR del Norte, confirmando la presencia de triclosán en dichas muestras.

Ellis, Revitt, & Lundy (2013), señala que algunos contaminantes emergentes (PE) ahora están regulados como sustancias peligrosas o prioritarias. El uso excesivo de estas nuevas sustancias requiere estudios específicos a que concentraciones pueden ser tóxicos para diferentes organismos acuáticos. Las legislaciones en países europeos ya han incorporado

concentraciones mínimas para diversos productos de limpieza y aseo personal, sin embargo aún se desconoce el efecto sobre diversos organismos acuáticos.

Beyond Pesticides (2011), la investigación analiza las publicaciones entre 2008 y 2010, demostrando las muchas formas en que el triclosán afecta de manera significativa la salud pública y ambiental. El gran número de nuevos estudios sobre triclosán publicados en los últimos dos años acentúa esta creciente preocupación. Los fabricantes de productos "antibacterianos" que usan triclosán, pronto no tendrán otra alternativa que eliminar este químico de sus formulaciones. En particular, la literatura más reciente destaca los considerables efectos sobre la salud humana y ambiental del triclosán. Lo que está surgiendo es una imagen más clara de los efectos de triclosán en el individuo y la cadena alimenticia.

Kumar, Rohini, & Devi (2015), menciona que el triclosán es un agente antimicrobiano sintético de amplio espectro que tiene una amplia gama de aplicaciones en diversos productos de cuidado personal y para el hogar. Es uno de los contaminantes más importantes de los países emergentes que se ha vuelto polémico en los últimos tiempos. La liberación de triclosán en los sistemas acuáticos causa efectos adversos sobre el medio ambiente y la biota. El triclosán siendo lipófilo tiende a acumularse en el tejido adiposo de los animales, en la orina, la sangre y la leche materna. Existe un debate científico sobre la seguridad y eficacia del uso de triclosán.

Caamaño (2015), se estudió los potenciales efectos nocivos del triclosán sobre diferentes parámetros relacionados con el crecimiento de la micro alga de agua dulce *Chlamydomonas moewusii*, como son la densidad celular, la concentración de pigmentos o la actividad celular. El triclosán resulta tóxico para la micro alga a concentraciones iguales o superiores a $0.75 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Esta toxicidad se ve reflejada en una inhibición del crecimiento, que es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al compuesto, el triclosán sí presenta efectos nocivos significativos ($p < 0.05$) en todos los parámetros de estudio.

Committee & Safety (2002), de una revisión de estudios, señala que se demuestra que el triclosán tiene una toxicidad aguda para los organismos acuáticos en concentraciones $< 1 \text{ mg/l}$, equivalente al límite de clasificación R50 (muy tóxico para los organismos acuáticos). Los datos reportados demuestran valores de LC_{50} en el rango de $0.26\text{-}0.54 \text{ mg/l}$ para peces. Se ha encontrado que los valores de CE_{50} para toxicidad aguda para

crustáceos están en el rango de 0.13 - 0.39 mg/l. Las algas parecen ser el organismo acuático más sensible al triclosán. Los valores de EC_{50} para la inhibición de la tasa de crecimiento se han encontrado en el rango de 1.4 a 19 $\mu\text{g/l}$ La concentración sin efecto tóxico más bajo reportado es 0.69 $\mu\text{g/l}$.

Dinh (2013), indica que se ha demostrado que el triclosán (TCS) se acumula en el tejido, causa toxicidad a organismos acuáticos y afecta la contracción muscular. Es fundamental desarrollar un bioensayo sensible para un producto químico tan frecuente en nuestro medio ambiente. Este estudio buscó determinar los efectos de TCS en el desarrollo embrionario, así como en el sistema biológico que detectaría el compuesto a niveles encontrados en aguas superficiales. El ensayo de Microtox realizado reveló que el TCS era altamente tóxico para *V. fischeri*. Pez cebra, *Danio rerio*, el ensayo de toxicidad confirmó TCS para causar deformidades en la columna vertebral. También se observaron defectos en embriones de pollo tratados con TCS que tenían un tamaño corporal más pequeño y una pigmentación ocular irregular en comparación con los embriones de control de la misma etapa.

Elmekki (2014), estudió la eficacia de los sistemas de aguas residuales actuales para reducir el triclosán y determinar cuán dependiente es la cantidad de bacterias resistentes en las concentraciones de triclosán en el medio ambiente. Se midieron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de bacterias resistentes y se extrajo y secuenció el ADN de bacterias resistentes para su identificación. Los resultados demostraron que el agua residual tratada contiene mucho menos triclosán y nitrógeno que el afluente, y se encontraron tendencias positivas entre las concentraciones de triclosán y el número de colonias resistentes, así como entre las concentraciones de nitrógeno disuelto y el número de colonias resistentes.

Madikizela, Muthwa, & Chimuka (2014); describe un método simple, sensible y rápido para la determinación de triclosán en aguas residuales afluentes, efluentes y agua de río. El método implica la extracción en fase sólida (SPE) de los compuestos utilizando el sorbente Oasis HLB. Se detectaron vestigios de triclosán en todas las muestras de aguas residuales en un rango de 1.2 a 9.0 μgL^{-1} , confirmando la presencia de esta sustancia tóxica en cuerpos de agua como lagos y ríos.

Guri (2012), indica que el triclosán fue probado para determinar el efecto de inhibición sobre las bacterias de aguas grises. Los valores de DQO se usaron para determinar las

diferencias entre los filtros con y sin la adición de triclosán. El triclosán también se agregó en dos experimentos de respiración con desarrollo microbiológico en botellas de vidrio cerradas. El registro de la caída de presión con el equipo WTW OxiTop® permitió estudiar las curvas de respiración. El triclosán tiene un efecto de inhibición sobre las bacterias de aguas grises, pero el efecto depende de ciertas condiciones. Los resultados indican que el triclosán en aquellas concentraciones que se han encontrado en aguas grises domésticas probablemente no afectará la capacidad de tratamiento de un filtro de aguas grises, sin embargo, muchas dudas hacen que sea necesario estudiar más el tema.

Khatikarn *et al.* (2016), indican los efectos tóxicos del triclosán en organismos de prueba acuáticos, siendo las micro algas las más sensibles. Sin embargo, las diferencias ambientales entre las regiones tropicales y templadas pueden haber seleccionado diferentes composiciones de rasgos entre estas dos regiones, lo que a su vez puede conducir a una diferencia en la sensibilidad de la especie. Los valores de LC_{50} de 96 horas para las especies de invertebrados estudiados oscilaron entre 72 y 962 $\mu\text{g/L}$. No hubo diferencias significativas entre la sensibilidad de las especies de invertebrados acuáticos de las regiones tropicales y templadas. Los valores de EC_{50} para *C. ellipsoidea*, con y sin tampón de pH, fueron significativamente diferentes. Los hallazgos de este estudio pueden usarse para respaldar los criterios de calidad del agua específicos del sitio y la evaluación del riesgo ambiental para TCS en regiones tropicales.

Marques *et al.* (2016), el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de triclosán en ambientes de una región subtropical, más específicamente en la región metropolitana de Curitiba (sur de Brasil) y los posibles efectos de estos compuestos en ambientes acuáticos. Se observaron altas concentraciones de parabenos, especialmente MeP (hasta 2875 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$). A pesar de las altas concentraciones de parabenos, su presencia tiene un bajo riesgo para los organismos acuáticos. El triclosán se ha observado a concentraciones más altas (415 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que sugiere una vez más que estos entornos se ven afectados por la acción humana. El RQ evaluó que el triclosán tiene un alto riesgo para ciertos grupos de organismos.

Orvos *et al.* (2002), la concentración efectiva media del triclosán a 48 h para *Daphnia magna* (EC_{50}) fue de 390 $\mu\text{g/L}$ y los valores de concentración letal media de 96 h para *Pimephales promelas* y *Lepomis macrochirus* fueron 260 y 370 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Una concentración de efecto no observado (NOEC) y la concentración de efecto más bajo

observada de 34.1 y 71.3 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, se determinaron con una prueba de toxicidad en fase de vida temprana con *Oncorhynchus mykiss*. Durante un estudio Scenedesmus de 96 horas, la EC_{50} de biomasa de 96 h fue de 1.4 $\mu\text{g/L}$ y la NOEC de 96 h fue de 0.69 $\mu\text{g/L}$.

Martínez (2014), el objetivo de su estudio fue conocer los efectos de los compuestos tóxicos nonilfenol (NP), triclosán (TCS) y bisfenol A (BPA) sobre larvas acuáticas del mosquito *Chironomus riparius*, un díptero empleado como organismo de referencia en los ensayos de toxicidad acuática, con la finalidad de identificar nuevos marcadores moleculares, bioquímicos y celulares de exposición a estos compuestos. El estudio de los efectos de los compuestos seleccionados se ha llevado a cabo mediante exposiciones a diferentes tiempos y a concentraciones subletales, analizándose los cambios de expresión de diferentes genes y de una actividad enzimática seleccionados como posibles biomarcadores de diferentes procesos celulares. Los resultados presentados en este trabajo han demostrado que los tres compuestos xenobióticos han sido capaces de alterar la expresión de los genes implicados en la ruta de respuesta a la ecdisona, actuando como antagonista en el caso del NP y como agonista en el caso del TCS y BPA, sugiriendo así una interacción directa de estos compuestos con el sistema endocrino de los insectos.

b. A nivel nacional

Ministerio de Salud (2017), indica que el triclosán puede ser utilizado como preservante en una concentración máxima del 0.3% para dentífricos, pastillas de jabón, jabones líquidos y geles de ducha, desodorantes (no en aerosol), polvos faciales y cremas correctoras y productos para limpiar las uñas de manos y pies antes de colocar uñas artificiales; y con una concentración máxima del 0.2% para enjuagues bucales.

Vera (2012), realizó un estudio con el objetivo realizar la evaluación del riesgo ambiental por el uso de tres productos químicos de limpieza doméstica. Se realizaron bioensayos ecotoxicológicos en *Poecilia reticulata* “guppy” para determinar la concentración letal media (LC_{50}). Se encontró que en los detergentes domésticos, los valores de la concentración letal media LC_{50} oscilaron entre 3.486 y 20.136; y para la LC_{50} 4.97 a 28.68 para las UT. Así mismo el análisis de Ji cuadrado permitió afirmar que sí existen diferencias significativas entre las diversas concentraciones de los tratamientos; encontrándose que los valores para “poet” fue de 0.792; para “suavizante para ropa” fue de 2.174 y para “lavavajilla” fue de 1.129. Se concluye que la concentración letal media

(LC₅₀) de los detergentes domésticos para *P. reticulata* presenta un nivel alto de toxicidad presente en estos detergentes.

c. A nivel local

Palao (2017), realizó un estudio con el objetivo de validar un método de cultivo de *Hyalella cuprea* en condiciones de laboratorio para la realización de bioensayos de toxicidad, se realizó los bioensayos con los efluentes, en concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25%, y su control con tres repeticiones en los meses de agosto, octubre y diciembre del 2016 y con ello se calculó la CL₅₀ y las UTas para cada lugar. Los resultados demuestran la factibilidad de la crianza de *H. cuprea* en condiciones de laboratorio, aunque con algunas limitantes, siendo los individuos adecuados para ensayos de ecotoxicidad los neonatos de 1.5 a 3 mm de longitud, de hasta 20 días de nacidos. En cuanto a las características toxicológicas, los efluentes de Espinar alcanzaron una CL₅₀ de 14.64% (6.83 UTa), considerada como altamente tóxica y la de mayor riesgo para el ecosistema integral; las aguas que ingresan por el barrio San José – UNA tuvieron una CL₅₀ de 50.64% (1.97 UTa) y las del Jr. Ricardo Palma con CL₅₀ de 93.95% (1.06 UTa), considerados como tóxicas; las aguas residuales del Jr. 9 de Octubre y barrio Vallecito presentaron CL₅₀ de 132.99% (0.75 UTa) y 135.56% (0.75 UTa) respectivamente, consideradas éstas como no tóxicas. Se concluye que las aguas residuales de mayor riesgo son las procedentes de la laguna Espinar y del Jr. Ricardo Palma del barrio San José UNA-Puno.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Definición del problema

Actualmente a nivel global la investigación sobre contaminantes proveniente de las actividades antrópicas, se ha desplazado de los contaminantes tradicionales, hacia los denominados contaminantes emergentes, dichos contaminantes emergentes, son definidos por la United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2006) como nuevos compuestos químicos que carecen de estatus regulador y cuyo impacto real en el ambiente es aún desconocido. Entre los más importantes se encuentran sustancias que son utilizadas en la formulación de productos de higiene personal, que incluyen una gran variedad de sustancias químicas, como son los medicamentos, los desinfectantes y las fragancias utilizadas en lociones, entre ellos destaca particularmente el triclosán por estar presente en jabones y pastas dentales que son productos utilizados diariamente en los hogares (Assessment, 2009).

La mayor parte de la descarga del triclosán se produce a través del desagüe después de su uso en los hogares en los productos de limpieza mencionados (Peña-Álvarez & Castillo-Alanís, 2015), sin embargo, este contaminante emergente, generalmente sufre pocas transformaciones o incluso ninguna en las plantas de tratamiento de aguas servidas tradicionales, produciéndose así su entrada en el medio ambiente, que por lo general son cuerpos de agua como ríos, lagunas, lagos y mares (Caamaño, 2015).

Considerando que el uso de productos antimicrobianos y antibacterianos es cada vez mayor a nivel mundial y por ende nuestro país y región, lo cual implica la liberación continua de estos compuestos en el medio, entre ellos el triclosán, haciendo que estas sustancias sean persistentes en los ecosistemas y que puedan bioacumularse (*Amdany et al.*, 2014). Por dichas razones estos contaminantes podrían tener un impacto negativo en diferentes organismos de los niveles tróficos de un cuerpo de agua, pudiendo conllevar a

alteraciones en la composición específica de las comunidades bióticas en general (Caamaño, 2015), fijándose aún en tejidos animales y vegetales (Sandoval, 2016).

En la región Puno se evidencia que los problemas ambientales por contaminación producida por el hombre son varios, sin embargo el más importante en la actualidad es el ingreso de aguas servidas hacia la bahía interior del lago Titicaca en la ciudad de Puno, situación que se presenta también en otras ciudades importantes como Juliaca. Si bien no existen estudios específicos sobre la contaminación por triclosán, es evidente que la misma debe ser importante, debido a que la mayor parte de aguas servidas provienen del agua utilizada en los hogares, donde el uso de productos de limpieza personal es una de las principales fuentes de contaminación (Palao, 2017).

Los estudios ecotoxicológicos demuestran que el triclosán tiene efecto toxico agudo para los organismos acuáticos en concentraciones <1 mg/l, equivalente a muy tóxico para los organismos acuáticos, los estudios reportados demuestran valores de concentración letal (LC_{50}) en el rango de 0.26 a 0.54 mg/l para peces, así mismo se reporta que esta sustancia es tóxica para crustáceos y otros organismo acuáticos (Committee & Safety, 2002).

Los estudios de toxicología por contaminantes, se realiza por lo general mediante bioensayos, es decir utilizando organismos vivos (animales o vegetales), en donde inicialmente se evalúa la toxicidad aguda, utilizando varias concentraciones del contaminante (Dinh, 2013), en tal sentido identificado el problema de contaminación por el triclosán es de interés evaluar su toxicidad en dos organismos de prueba estándares, como son *Daphnia pulex* y *Lactuca sativa*, el primero del medio acuático y el segundo de importancia debido a que el agua tratada, pero aún con contenido de triclosán, debe ser analizada para su uso en el riego ya sea para productos agrícolas de consumo humano u ornamentales.

2.2. Planteamiento del problema

En tal sentido planteamos las siguientes interrogantes:

2.2.1. Problema general:

¿Qué grado de toxicidad presenta el triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) y “lechuga” (*Lactuca sativa*) utilizando bioensayos?

2.2.2. Problemas específicos:

- ¿Cuál es la concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) analizada mediante bioensayo?
- ¿Cuál es la concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo?
- ¿Cuál es la concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) y “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo?

2.3. Justificación

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), el 02-09-2016 emitió un comunicado, en el que dio a conocer que no se podrán comercializar jabones antibacteriales y geles de baño de venta libre que contengan diecinueve ingredientes, entre los que se incluye el triclosán y triclocarbán; esto debido a que los fabricantes no han presentado información que demuestre que su uso a largo plazo fuera más seguro y eficaz que el uso del jabón tradicional frente a la prevención y la propagación de ciertas enfermedades.

Sin embargo el Perú por pertenecer a la Comunidad Andina de Naciones (CAN), todos los productos cosméticos se encuentran regulados por normas supranacionales, por lo que con la información disponible a la fecha, los países andinos inician consultas para evaluar el uso de los ingredientes triclosán y triclocarbán en base a pruebas científicas, analizar la información científica disponible y tomar una decisión (Ministerio de Salud, 2017), por lo que la situación actual en el país es el de realizar investigaciones que aporten pruebas efectivas respecto al efecto antibacteriano del triclosán, pero adicionalmente evaluar su toxicidad y efectos negativos a organismos vivos de los ambientes naturales a los cuales son vertidas aguas servidas con esta sustancia.

Por lo que el presente estudio busca contribuir con la evaluación de este contaminante emergente (Triclosán), mediante ensayos de toxicidad aguda, utilizando organismos vivos (bioensayos), un organismo animal y otro vegetal ya utilizados en estudios de toxicidad, los resultados permitirán establecer cuál es la toxicidad de esta sustancia, determinando la concentración letal media para los dos organismos de prueba, así mismo permitirá determinar cuál es la concentración sin efecto adverso, contribuyendo con

información científica que permita tomar decisiones sobre el uso del triclosán y los efectos del mismo en organismos vivos.

2.4. Objetivos de la investigación

2.4.1. Objetivo general:

Evaluar la toxicidad que presenta el triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) y “lechuga” (*Lactuca sativa*) utilizando bioensayos.

2.4.2. Objetivos específicos:

- Determinar la concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) analizada mediante bioensayo.
- Determinar la concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo.
- Estimar la concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) y “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo.

2.5. Hipótesis de la investigación

2.5.1. Hipótesis general:

El triclosán presenta toxicidad sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) y “lechuga” (*Lactuca sativa*) utilizando bioensayos.

2.5.2. Hipótesis específicas:

- Existe una concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) analizada mediante bioensayo.
- Existe una concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo.
- Existe una concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) y “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio del Proyecto Especial Truchas Titicaca – PETT - Inculaya, Chucuito y en el Gabinete de Ecología Acuática adscrito a la Facultad de Ciencias Biológicas, ubicado en la Universidad Nacional del Altiplano, que se encuentra ubicada en la ciudad de Puno, Perú.

3.2. Población y tamaño de muestra

Población: Se consideró como población a individuos de *Daphnia pulex* (adultos), provenientes de un cultivo monoparental. La población de semillas de lechuga fue considerada del mismo lote de la marca registrada (Hortus).

Muestra: La muestra estuvo formada por parte de la población indicada para ambos casos, cumpliendo con el requisito de 5 réplicas para cada concentración (Castillo, 2004).

3.3. Métodos

3.3.1. Concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre *Daphnia pulex* mediante bioensayo.

Actualmente el Perú no cuenta con una norma técnica de evaluación de toxicidad ambiental, por lo que la metodología se basa en el documento “Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms”, de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA, 2016).

Material biológico

Daphnia pulex (adultos)

Materiales de laboratorio

Acuarios de 3 litros de capacidad
Vasos de precipitado de 2000, 1000 y 600 ml
Envases de plástico
Bidones de 20 litros de capacidad
Pipetas volumétricas
Botellas de vidrio boca ancha 1 litro
Embudo de vidrio

Equipos

Microscopio Compuesto marca NIKON
Multiparámetro Hanna HI 9828
GPS marca GARMIN

Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

Los cultivos de *Daphnia pulex* se obtuvieron de la península de Chucuito (zona Barco), capturados con redes de arrastre, los que fueron mantenidos en acuarios de dos litros, con una densidad poblacional no mayor de 12 individuos por litro. Los organismos se mantuvieron en agua libre de contaminación del lago Titicaca. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 15 ± 2 °C, un fotoperiodo aproximado de 16 h luz/8 h oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 540- 1080 luxes (US EPA, 2002).

Procedimiento de la prueba

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *D. pulex* se empleó adultos que fueron expuestos a diferentes concentraciones de triclosán durante un periodo de 48 h. Como resultado de dicha exposición se determinó la concentración de la muestra que producirá la muerte al 50% de la población de adultos expuestos (concentración letal media o CL₅₀), con un nivel de confiabilidad del 95% (Castillo, 2004).

Diseño experimental

Se utilizó el diseño en bloque completamente al azar (DBCA), donde el factor de estudio fue el triclosán (X1), el mismo que tuvo seis concentraciones y los bloques

formados por los tiempos de exposición (X2), haciendo un total de 28 unidades experimentales, la variable de respuesta fue la mortalidad del organismo de prueba (Y), además del control negativo sin adición de sustancia tóxica alguna.

Cada unidad experimental estuvo formada por 10 individuos de “pulga de agua” *Daphnia pulex*, la variable de respuesta fue el número de organismos muertos en un mismo tiempo de evaluación.

Se ajustó una regresión no lineal, considerando como variable independiente las concentraciones de triclosán y como variable de respuesta la mortalidad de los individuos, por ser una variable dicótoma (muerto o vivo), se realizó una transformación de la variable de respuesta mediante probits.

3.3.2. Concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre *Lactuca sativa* mediante bioensayos.

Material biológico

Lactuca sativa (semillas)

Materiales de laboratorio

Vaso de precipitado de 2000, 1000 y 600 ml

Bidones de 20 litros

Pipetas volumétricas, peras para pipetas

Bidones 20 litros

Botellas de vidrio boca ancha 1l

Placas Petri

Equipos

Microscopio Compuesto marca NIKON

Multiparámetro Hanna HI 9828

GPS marca GARMIN

Diseño experimental

Se utilizó el diseño en bloque completamente al azar (DBCA), donde el factor de estudio fue el triclosán (X1) el mismo que tuvo seis concentraciones, como bloques los tiempos de exposición (X2), la variable de respuesta fue la inhibición del crecimiento de la radícula e hipocotilo (Y), el número de repeticiones por tratamiento fue de 3, haciendo un total de 28 unidades experimentales, además del control negativo sin adición de sustancia tóxica alguna.

Cada unidad experimental estuvo formada por 10 semillas de *Lactuca sativa*, la variable de respuesta fue la inhibición de crecimiento en relación al control negativo.

Organismo de prueba

Se emplearon semillas de la especie *Lactuca sativa*, de una marca registrada (Hortus).

Obtención, control y conservación de las semillas

La obtención de las semillas de lechuga fue de la compañía Hortus (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Las semillas seleccionadas se almacenaron a 4 °C, en oscuridad y en ambiente seco hasta su uso (Sobrero & Ronco, 2004).

Procedimiento de prueba

Preparación de las diluciones

Se prepararon 6 concentraciones y un control de las muestras de triclosán con un factor de dilución apropiado para obtener valores de toxicidad.

Desarrollo de la prueba

- Se colocó en cada placa Petri un disco de papel de filtro.
- Se rotuló cada placa con la concentración correspondiente.
- Agregamos 4 ml de la concentración evitando que se formen bolsas de aire.
- Colocamos las 10 semillas empleando una pinza, cuidando el espacio suficiente entre las mismas para permitir la elongación de las raíces.
- Se cubrió las placas y se colocaron en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad.
- Se incubaron por 7 días a una temperatura de 22 ± 2 °C.
- Se realizaron 3 repeticiones para cada dilución ensayada.

Efecto en la germinación

Se registró el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de evaluación la aparición visible de la radícula.

Efecto de inhibición en crecimiento de radícula e hipocotilo

Se midió la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración y a los controles, utilizando papel milimetrado y calibrador (vernier).

La medida de elongación de la radícula se consideró desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se consideró desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.

Se ajustó una regresión no lineal, considerando como variable independiente las concentraciones de triclosán y como variable de respuesta la no germinación de semillas, por ser una variable dicótoma (muerto o viable), se realizó una transformación de la variable de respuesta mediante logaritmos.

3.3.3. Concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre *Daphnia pulex* y *Lactuca sativa*.

Para este objetivo se utilizó una prueba de comparación pareada:

Prueba de Dunnet

Esta prueba permitió comparar cada una de las otras K-1 medias de los tratamientos contra el control, por lo tanto, existen K-1 comparaciones. Un procedimiento para realizar estas comparaciones es la prueba de Dunnett. Si se supone que el control es el tratamiento a, entonces se desea probar las hipótesis (US Environmental Protection Agency, 2002).

$$\left. \begin{array}{l} H_0 : \mu_1 = \mu_e \\ H_e : \mu_1 \neq \mu_e \end{array} \right\} \text{ para } i=1,2,\dots,K-1$$

El procedimiento de Dunnett es una modificación de la prueba t. Para cada hipótesis se calculó el valor absoluto de la diferencia de medias observadas.

El rechazo de la hipótesis nula se realiza con una probabilidad de error tipo I, como se muestra:

$$|\bar{X}_i - \bar{X}_e| > d_{e,k-1f} \sqrt{CM_E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_e} \right)}$$

Donde la constante $d_{\alpha,k-1f}$ se busca en la tabla de valores respectiva. Donde α es el nivel de significación asociado con todos las K-1 pruebas y utilizado en el análisis de varianza.

Operacionalización de variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADOR	ÍNDICE	ESCALA
Independiente X1= Triclosán	Triclosán	Concentraciones	0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1 mg·l ⁻¹	Continua
Independiente X2= Tiempo	Tiempo	Tiempo de exposición	6, 12, 18 hrs	Continua
Dependiente Y= Toxicidad en organismos vivos	<i>Daphnia pulex</i> <i>Lactuca sativa</i>	<ul style="list-style-type: none"> Mortalidad de individuos Crecimiento de radícula e hipocotilo 	<ul style="list-style-type: none"> Número de individuos muertos Longitud total de la plántula. 	Continua

Constantes: el número de organismo utilizados en cada ensayo, los parámetros fisicoquímicos requeridos durante el mantenimiento de los organismos y durante las pruebas toxicológicas (pH, dureza, temperatura y oxígeno disuelto).

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Concentración letal media (CL₅₀) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) analizada mediante bioensayo.

Tabla 1

Parámetros fisicoquímicos de las concentraciones de triclosán utilizadas en el estudio

Concentración	Agua		Triclosán (g·l ⁻¹)				
	Control	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
O.D.	7.98	7.95	6.32	5.06	4.72	4.65	4.62
pH	7.88	7.76	7.69	7.65	7.6	7.66	7.56
T°	16.2	16.2	15.8	16	16.3	17.2	17.4

Fuente: elaboración propia

Los valores de oxígeno disuelto mostraron una variación apreciable, siendo la tendencia a disminuir su contenido a mayor concentración de triclosán, respecto al pH del agua se observó variaciones mínimas cercanas a un valor neutro, la temperatura del agua estuvo en función del ambiente de trabajo, manteniéndose estable alrededor de los 16 °C.

4.1.1. A las 6 horas de exposición

La primera evaluación del número de individuos muertos de *Daphnia pulex* expuestos a seis concentraciones de triclosán, se realizó a las 6 horas, los resultados fueron:

Tabla 2

Mortalidad de *Daphnia pulex* como efecto de concentraciones de triclosán a las 6 horas de exposición

Repeticiones	Agua		Triclosán (g·l ⁻¹)				
	Control	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
Repetición 1	1	2	2	3	3	3	3
Repetición 2	0	1	2	2	3	3	3
Repetición 3	0	3	1	1	3	2	3
Repetición 4	0	2	1	2	2	2	2
Repetición 5	1	1	2	2	2	3	3
Promedio	0	2	2	2	3	3	3

Fuente: elaboración propia

A las 6 horas de exposición al triclosán los individuos de *Daphnia pulex* empezaron a mostrar efectos toxicológicos expresados en su mortalidad, para el tratamiento control solo con agua, se obtuvo un promedio de cero individuos muertos, mientras que en las concentraciones de triclosán de 0.1, 0.3 y 0.5 g·l⁻¹ se obtuvo en promedio dos individuos muertos respectivamente, para las concentraciones superiores de 0.7, 0.9 y 1.1 g·l⁻¹ de triclosán se obtuvo un promedio de tres individuos muertos respectivamente para cada concentración.

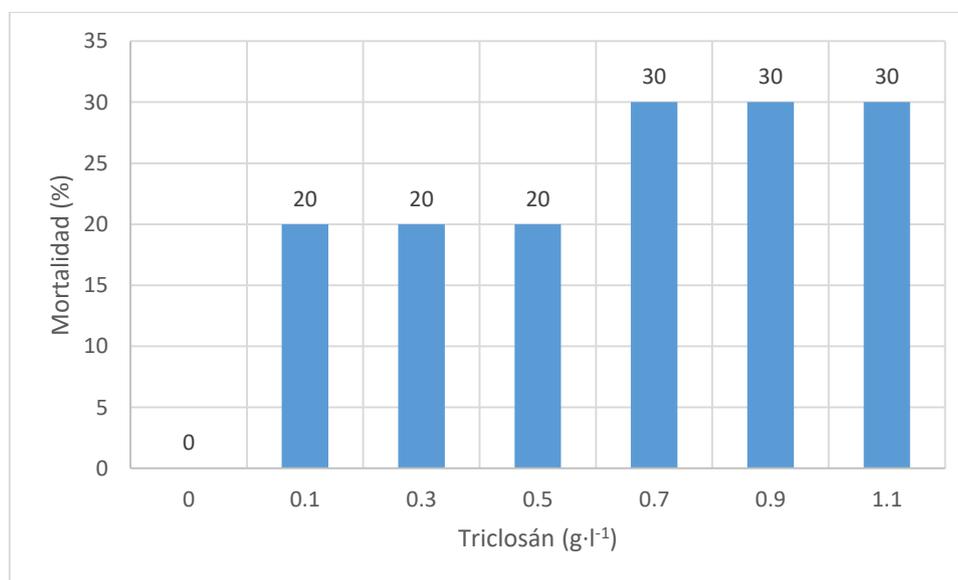


Figura 1. Mortalidad (%) de *Daphnia pulex* como efecto de concentraciones de triclosán a las 6 horas de exposición

En términos porcentuales a las 6 horas de exposición al triclosán, los individuos de *Daphnia pulex* empezaron a mostrar efectos toxicológicos expresados en su

mortalidad, para el control sólo con agua, se obtuvo un promedio de 0% de mortalidad, mientras que en la concentraciones de triclosán de 0.1, 0.3 y 0.5 g·l⁻¹ se obtuvo en promedio 20% de mortalidad, para las concentraciones superiores de 0.7, 0.9 y 1.1 g·l⁻¹ se obtuvo en promedio 30% de mortalidad respectivamente para cada concentración.

Los resultados en esta primera evaluación (6 horas), indican claramente que se produce la fase inicial de los procesos de toxicidad, caracterizada por la respuesta inicial de los organismos a la sustancia tóxica, estos efectos se expresan en una mortalidad inicial poco acentuada, pues el organismo trata de adaptarse a las concentraciones de triclosán y realiza los ajustes fisiológicos para lograr su sobrevivencia.

4.1.2. A las 12 horas de exposición

La segunda evaluación del número de individuos muertos de *Daphnia pulex* expuestos a seis concentraciones de triclosán, se realizó a las 12 horas, los resultados fueron:

Tabla 3

Mortalidad de Daphnia pulex como efecto de concentraciones de triclosán a las 12 horas de exposición

Repeticiones	Agua		Triclosán (g·l ⁻¹)				
	Control	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
Repetición 1	1	4	4	5	5	5	5
Repetición 2	0	3	4	4	5	5	5
Repetición 3	0	5	3	3	5	4	5
Repetición 4	0	4	3	4	4	4	4
Repetición 5	1	3	4	4	4	5	5
Promedio	0	4	4	4	5	5	5

Fuente: elaboración propia

A las 12 horas de exposición al triclosán los individuos de *Daphnia pulex* muestran un mayor efecto toxicológico manifestado en su mortalidad, para el tratamiento control sólo con agua se obtuvo un promedio de cero individuos muertos, mientras que en la concentraciones de triclosán de 0.1, 0.3 y 0.5 g·l⁻¹ se obtuvo en promedio cuatro individuos muertos, para las concentraciones superiores de 0.7, 0.9 y 1.1 g·l⁻¹ de triclosán se obtuvo en promedio cinco individuos muertos respectivamente.

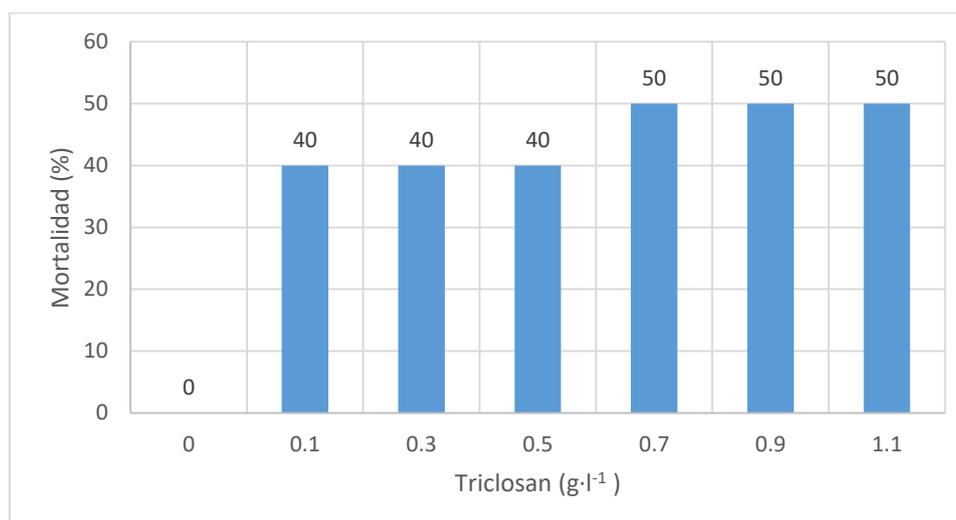


Figura 2. Mortalidad (%) de *Daphnia pulex* como efecto de concentraciones de triclosán a las 12 horas de exposición

En términos porcentuales a las 12 horas de exposición al triclosán, los individuos de *Daphnia pulex* empezaron a evidenciar una mayor mortalidad como efecto toxicológico agudo, para el control sólo con agua se obtuvo un promedio de 0% de mortalidad, mientras que en las concentraciones de triclosán de 0.1, 0.3 y 0.5 g·l⁻¹ se obtuvo en promedio 40% de mortalidad respectivamente, para las concentraciones superiores de 0.7, 0.9 y 1.1 g·l⁻¹ de triclosán se obtuvo en promedio un 50% de mortalidad respectivamente.

Los resultados en esta segunda etapa de evaluación (12 horas), indican la fase secundaria de los procesos de toxicidad, la misma caracterizada por un incremento de casi el doble de mortalidad de la fase de inicio, estos efectos se expresan en una mortalidad más acentuada, pues el organismo ha estado expuesto un tiempo suficiente para ser afectado por la sustancia tóxica (triclosán), por lo que el ajuste fisiológico no es suficiente para evitar el colapso fisiológico y posterior muerte.

4.1.3. A las 18 horas de exposición

La tercera evaluación del número de individuos muertos de *Daphnia pulex* expuestos a seis concentraciones de triclosán, se realizó a las 18 horas, los resultados fueron:

Tabla 4

Mortalidad de *Daphnia pulex* como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición

Repeticiones	Agua		Triclosán (g·l ⁻¹)				
	Control	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
Repetición 1	1	4	6	8	9	9	10
Repetición 2	0	3	6	8	9	10	10
Repetición 3	0	5	5	9	10	10	10
Repetición 4	1	4	5	9	8	9	10
Repetición 5	1	3	5	7	7	9	10
Promedio	1	4	5	8	9	9	10

Fuente: elaboración propia

A las 18 horas de exposición al triclosán los individuos de *Daphnia pulex* muestran ya el mayor efecto toxicológico, expresado en una mayor mortalidad, para el control sólo con agua se obtuvo un promedio de un individuo muerto, mientras que en la concentración de triclosán de 0.1 g·l⁻¹ se obtuvo cuatro, con 0.3 g·l⁻¹ presentó en promedio cinco individuos muertos y con 0.5 g·l⁻¹ se obtuvo en promedio ocho individuos muertos, mientras que para las concentraciones superiores de 0.7 y 0.9 g·l⁻¹ se obtuvo en promedio nueve individuos muertos respectivamente, finalmente para la concentración de 1.1 g·l⁻¹ de triclosán se obtuvo en promedio la totalidad de individuos muertos (diez).

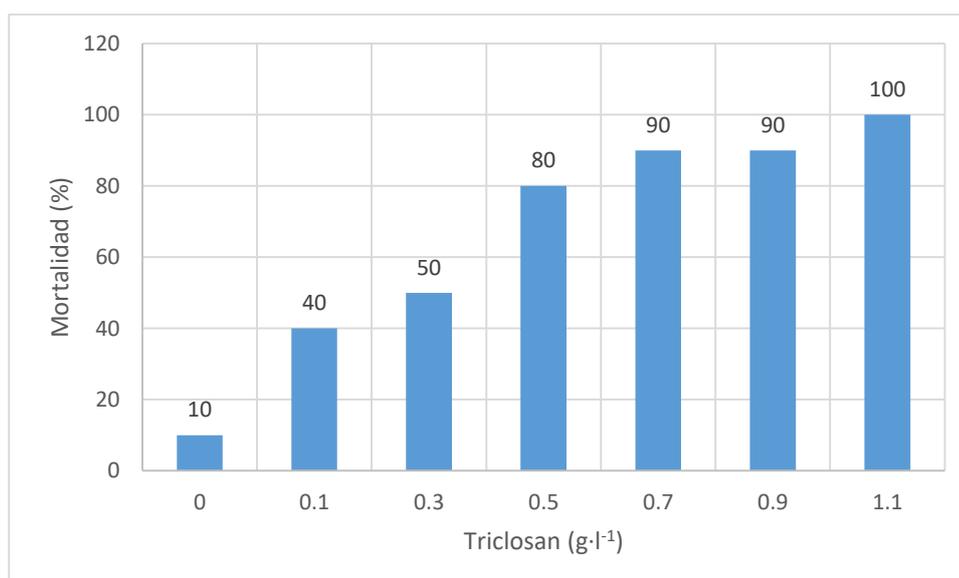


Figura 3. Mortalidad (%) de *Daphnia pulex* como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición

En términos porcentuales a las 18 horas de exposición al triclosán, los individuos de *Daphnia pulex* mostraron el mayor efecto tóxico, para el control sólo con agua se obtuvo un promedio de 10% de mortalidad, mientras que en las concentraciones de triclosán de $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ se tiene 40% de mortalidad, con $0.3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ se obtuvo 50% de mortalidad, con $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ se obtuvo en promedio 80% de mortalidad, para las concentraciones superiores de 0.7 y $0.9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ se tiene 90% de mortalidad y finalmente con $1.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán se obtuvo en promedio 100% de mortalidad.

Los resultados en esta tercera evaluación (18 horas), indican la fase final de los procesos de toxicidad, la misma caracterizada por la manifestación de la mortalidad total acumulada más alta en concentraciones superiores, estos efectos se expresan en la formación de una asíntota superior de la curva sigmoide que expresa este proceso, pues el efecto tóxico ha mostrado ya su mayor efecto.

Una vez finalizado el bioensayo de toxicidad aguda, en nuestro caso a las 18 horas de exposición, se procedió al análisis estadístico para determinar la concentración letal media (CL50), que indica la cantidad de sustancia tóxica que causa la muerte del 50% de la población de *Daphnia pulex*, a continuación se muestra el análisis de varianza del modelo sigmoide aplicado a los resultados de mortalidad.

Tabla 5.

Análisis de varianza del modelo sigmoide para mortalidad de Daphnia pulex como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición

Parámetro	DF	Estimador	Error estándar	Límites de confianza al 95%		Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
Intercepto	1	1.4457	0.3364	0.7865	2.1050	18.47	<.0001**
Log10(Dose)	1	2.2673	0.8327	0.6353	3.8993	7.41	0.0065**
C	1	0.1186	0.1172	-0.1110	0.3483		

Fuente: elaboración propia **diferencia altamente significativa ($p < 0.01$)

El ANOVA indica la existencia de diferencia estadística significativa para el intercepto ($p < 0.05$), por lo cual este término del modelo puede utilizarse para analizar esta relación entre concentraciones (dosis) de triclosán y la mortalidad observada, así mismo el segundo componente también mostró significancia estadística ($p < 0.05$), por lo que el modelo sigmoide con transformaciones Probit evidenció consistencia estadística para su utilización en la determinación de la CL₅₀.

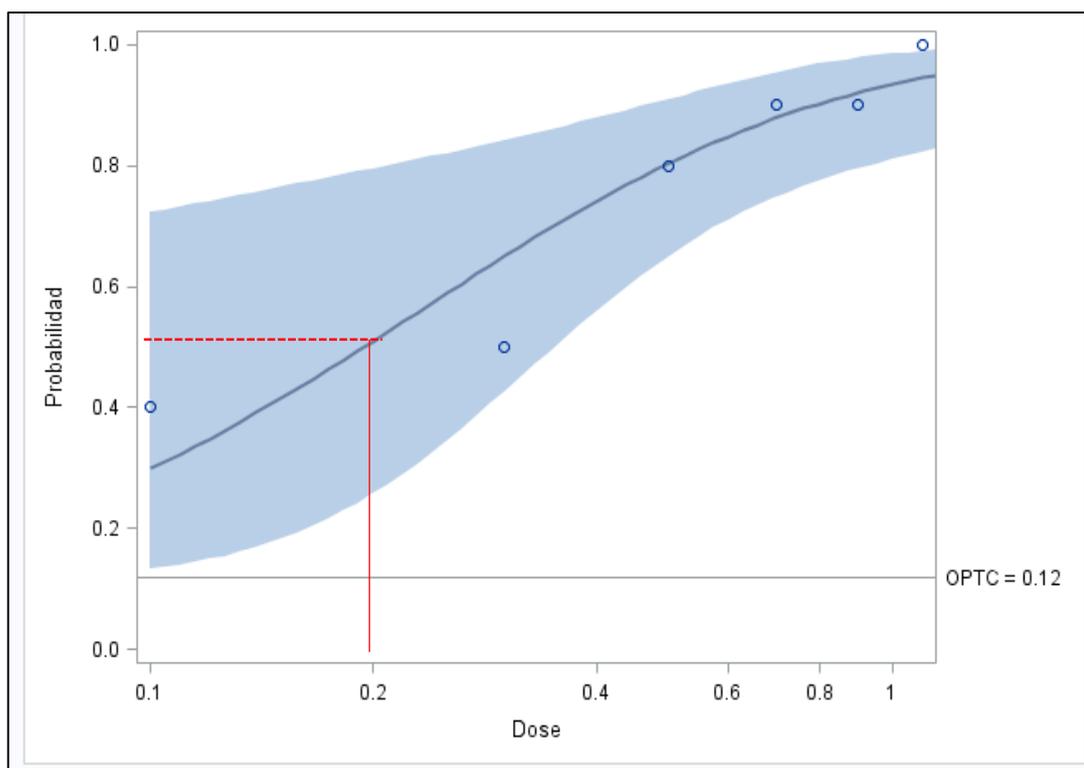


Figura 4. Modelo sigmoide para probabilidad de mortalidad de *Daphnia pulex* como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición

El modelo de regresión sigmoide permite obtener mediante interpolación la CL_{50} del triclosán sobre *Daphnia pulex*, para nuestro estudio el valor estimado para causar la mortalidad del 50% de una población fue estimada en $0.17938 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán, el intervalo inferior al 95% de confianza es de $0.06036 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y el intervalo superior de $0.28704 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, el resto de probabilidades para diferentes rangos porcentuales se muestran en el anexo 5.

Tabla 6
Análisis de varianza para mortalidad de *Daphnia pulex* como efecto de concentraciones de triclosán a las 18 horas de exposición

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-Valor	Pr > F
Concentraciones	6	8.48682253	1.41447042	44.76	<0.0001**
Tiempo de exposición	2	12.1773395	6.08866977	192.69	<0.0001**
Error	96	3.03341335	0.03159806		
Total corregido	104	23.6975754			

Y=Log (y+5) **Diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) CV%=7.5

Se observa la existencia de diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), de lo cual se interpreta que existió un efecto notorio de las concentraciones de triclosán sobre la mortalidad de *Daphnia pulex*, del mismo modo se evidencia un efecto del tiempo

de exposición, las pruebas de rango múltiples se muestran en anexos, de estos resultados es claro el efecto de los dos factores considerados en el estudio.

Los resultados ponen en claro que el triclosán tiene un efecto toxicológico sobre los organismos de prueba, considerando el amplio uso de esta sustancia en productos de higiene personal, es de suponer su presencia en las aguas servidas de la ciudad de Puno que desembocan en la bahía interior del lago Titicaca, por lo que parte de la toxicidad observada en estudios que utilizaron dichas aguas podría ser atribuida al triclosán, entre otras sustancias tóxicas que forman el complejo de aguas servidas como ha sido demostrado en un estudio anterior (Palao, 2017).

Nuestros resultados demostrando la toxicidad de esta sustancia, coincide con lo señalado en otro estudio donde indican que la liberación de triclosán en los sistemas acuáticos causa efectos adversos sobre el medio ambiente y la biota, siendo lipófilo tiende a acumularse en el tejido adiposo de los animales, en la orina, la sangre y la leche materna, actualmente existe un debate científico sobre la seguridad y eficacia del uso de triclosán (Kumar *et al.*, 2015).

Por otro lado el Committee & Safety (2002), indica que el triclosán tiene una toxicidad aguda para los organismos acuáticos en concentraciones <1 mg/l, equivalente al límite de clasificación R50 (muy tóxico para los organismos acuáticos), indican valores de LC_{50} en el rango de 0.26-0.54 mg/l para peces, mientras que los valores de CE_{50} para toxicidad aguda para crustáceos están en el rango de 0.13 - 0.39 mg/l, estos resultados están por debajo de los reportados en nuestro estudio, atribuible al tiempo de exposición en el que se obtuvo la mortalidad total (alrededor de 18 horas), sin embargo queda claro que esta sustancia estaría causando la mortalidad tanto de crustáceos como peces en los ambientes acuáticos donde es acumulado por su baja tasa de descomposición.

Así mismo Dinh (2013), indica que se ha demostrado que el triclosán se acumula en el tejido, causa toxicidad a organismos acuáticos y afecta la contracción muscular, determinó que el triclosán era altamente tóxico para *V. fischeri* (pez cebra), además señala que causa deformidades en la columna vertebral. También se observaron defectos en embriones de pollo tratados con TCS que tenían un tamaño corporal más pequeño y una pigmentación ocular irregular, nuestros resultados revelan la toxicidad aguda del triclosán sobre *Daphnia pulex*, sin embargo debería

proseguirse estudios que abarquen el campo de toxicidad crónica con las concentraciones más bajas a las utilizados en el presente estudio, para evaluar efectos subletales.

Khatikarn, Satapornvanit, Price, & van Den Brink (2016), señalan valores de LC_{50} de 96 horas para las especies de invertebrados estudiados oscilaron entre 72 y 962 $\mu\text{g/L}$. No hubo diferencias significativas entre la sensibilidad de las especies de invertebrados acuáticos de las regiones tropicales y templadas. Los valores de EC_{50} para *C. ellipsoidea*, con y sin tampón de pH, fueron significativamente diferentes. Los hallazgos de este estudio pueden usarse para respaldar los criterios de calidad del agua específicos del sitio y la evaluación del riesgo ambiental para triclosán en regiones tropicales, tales conclusiones también son válidas para nuestro estudio, donde el Estado mediante los organismos pertinentes debería legislar sobre el uso excesivo de esta sustancia, considerando la toxicidad evidenciada en el presente estudio y los antecedentes también señalados.

Del mismo modo Orvos *et al.* (2002), indican que la concentración efectiva media del triclosán a 48 h para *Daphnia magna* (EC_{50}) fue de 390 $\mu\text{g/L}$ y los valores de concentración letal media de 96 h para *Pimephales promelas* y *Lepomis macrochirus* fueron 260 y 370 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, estas concentraciones son menores a las estimadas en nuestro estudio, lo que indicaría que la toxicidad de esta sustancia es clara, esta tendencia a demostrar la poca utilidad de esta sustancia como antibacteriano y más bien perjudicial para los ecosistemas acuáticos, ha permitido un primer pronunciamiento del Ministerio de Salud, (2017), donde recomienda que el triclosán puede ser utilizado como preservante en una concentración máxima del 0.3% para dentífricos, pastillas de jabón, jabones líquidos y geles de ducha, desodorantes (no en aerosol), esto indica una primera acción en el país para regular el uso de esta sustancia.

Por otro lado Vera (2012), realizó un estudio con el objetivo realizar la evaluación del riesgo ambiental por el uso de tres productos químicos de limpieza doméstica que contenían triclosán en su composición, donde concluye que la concentración letal media (LC_{50}) de estos productos domésticos son tóxicos para *P. reticulata* presentando un nivel alto de toxicidad, por lo que nuestros resultados se respaldan en este antecedente donde productos con contenido de triclosán causan mortalidad

de organismos acuáticos, suponiendo la cantidad de estos productos que se descargan en el lago Titicaca es de esperar efectos similares a los señalados.

Martínez (2014), señala que se ha demostrado que los tres compuestos xenobióticos (entre ellos triclosán) han sido capaces de alterar la expresión de los genes implicados en la ruta de respuesta a la ecdisona, actuando como agonista en el caso del triclosán, sugiriendo así una interacción directa de estos compuestos con el sistema endocrino de los insectos, si bien el estudio realizado corresponde al caso de toxicidad aguda, otros estudios de la cronicidad del triclosán podrían esclarecer el efecto de concentraciones más bajas a las utilizadas, pero que tendrían efectos como genotoxicidad que han sido indicados en esta referencia.

4.2. Concentración de inhibición media (CL₅₀) del triclosán sobre “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo.

La evaluación de toxicidad del triclosán sobre semillas de *Lactuca sativa*, no mostró efecto alguno sobre el porcentaje de germinación, por lo que se procedió a realizar evaluaciones respecto a la inhibición de crecimiento que causó esta sustancia en el desarrollo de la plántula.

4.2.1. A los 3 días de exposición

Tabla 7

Longitud total de plántula (cm) en semillas de lechuga sometidas a concentraciones de triclosán a los 3 días de exposición

Estadístico	Agua			Triclosán			
	0 g·l ⁻¹	1 g·l ⁻¹	2 g·l ⁻¹	3 g·l ⁻¹	4 g·l ⁻¹	5 g·l ⁻¹	6 g·l ⁻¹
N	10	10	10	10	10	10	10
Mínimo	3.12	3.02	3.11	1.84	1.44	1.89	0.90
Máximo	3.65	3.81	3.74	2.95	3.54	3.05	2.39
Media	3.32	3.36	3.35	2.43	2.17	2.47	1.65
D.E.	0.26	0.39	0.23	0.42	0.88	0.48	0.59

Fuente: elaboración propia

A los 3 días de germinación, la longitud total de la plántula de lechuga en el tratamiento control con agua mostró un crecimiento promedio de 3.32 cm, mientras que las concentraciones más bajas de triclosán con 1 y 2 g·l⁻¹ no mostraron diferencia estadística con el control ($p > 0.05$), las concentraciones de 3, 4, 5 y 6 g·l⁻¹ de triclosán sí mostraron un efecto inhibitorio de crecimiento de la plántula al ser estadísticamente diferentes al tratamiento control ($p < 0.05$) (anexo 6).

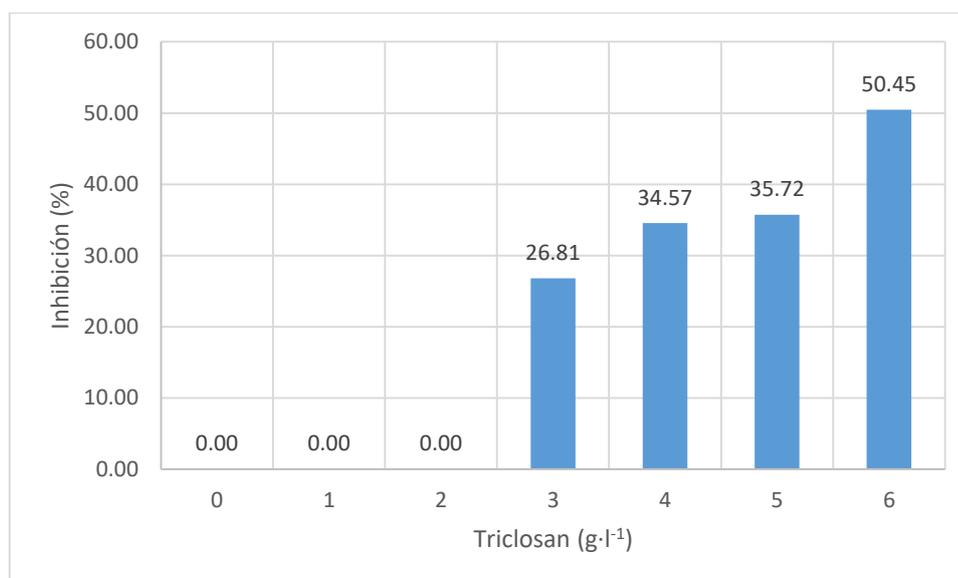


Figura 5. Inhibición porcentual de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 3 días de exposición

En términos de porcentaje de inhibición, se determinó que en promedio el tratamiento control y las concentraciones de 1 y 2 g·l⁻¹ de triclosán mostraron en promedio 0% de inhibición, es decir el crecimiento fue similar no evidenciándose efecto en estas concentraciones, sin embargo a partir de 3 g·l⁻¹ sí se observó efecto inhibitorio con 26.81% y en la concentración más alta se obtuvo un 50.45% de inhibición de crecimiento de la plántula.

4.2.2. A los 5 días de exposición

Tabla 8

Longitud total de plántula (cm) en semillas de lechuga sometidas a concentraciones de triclosán a los 5 días de exposición

Estadístico	Agua		Triclosán				
	0 g·l ⁻¹	1 g·l ⁻¹	2 g·l ⁻¹	3 g·l ⁻¹	4 g·l ⁻¹	5 g·l ⁻¹	6 g·l ⁻¹
N	10	10	10	10	10	10	10
Mínimo	3.37	3.99	4.66	2.93	2.10	2.27	2.48
Máximo	5.27	5.36	5.34	3.77	4.52	3.21	4.10
Media	4.00	4.52	4.93	3.34	3.05	2.79	3.07
D.E.	0.80	0.52	0.32	0.33	0.94	0.34	0.65

Fuente: elaboración propia

A los 5 días de germinación, la longitud total de la plántula de lechuga en el tratamiento control con agua mostró un crecimiento promedio de 4.00 cm, mientras que las concentraciones más bajas de triclosán con 1 y 2 g·l⁻¹ no mostraron diferencia estadística con el control (p>0.05), las concentraciones de 3, 4, 5 y 6 g·l⁻¹

¹ de triclosán si mostraron un efecto inhibitorio de crecimiento de la plántula al ser estadísticamente diferentes al tratamiento control ($p < 0.05$) (anexo 6).

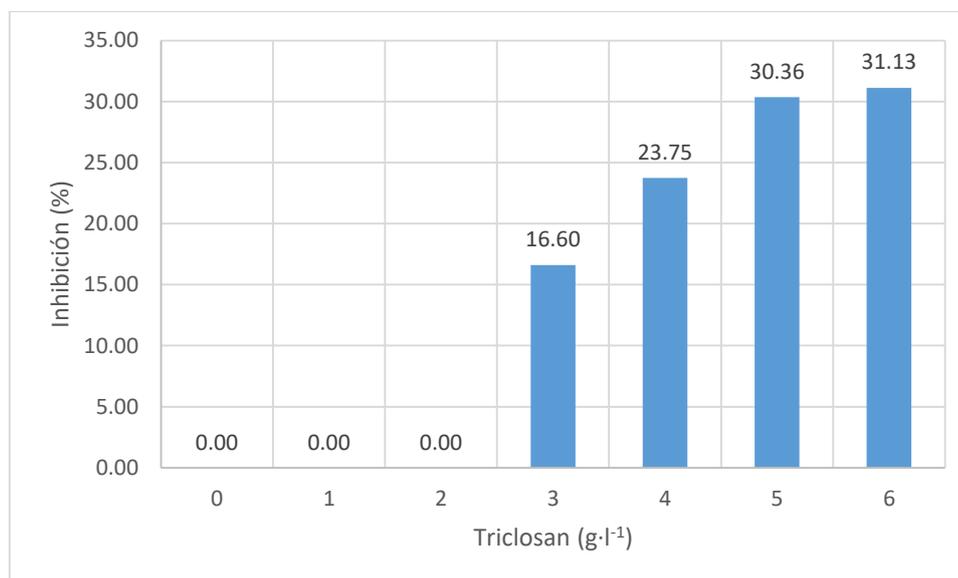


Figura 6. Inhibición porcentual de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 5 días de exposición

Evaluando los porcentajes de inhibición, se determinó que en promedio el tratamiento control y las concentraciones de 1 y 2 g·l⁻¹ de triclosán mostraron en promedio 0% de inhibición, es decir el crecimiento fue similar no evidenciándose efecto en estas concentraciones, sin embargo a partir de 3 g·l⁻¹ sí se observó efecto inhibitorio con 16.60% y en la concentración más alta se obtuvo un 31.13% de inhibición de crecimiento de la plántula.

4.2.3. A los 7 días de exposición

Tabla 9

Longitud total de plántula (cm) en semillas de lechuga sometidas a concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición

Estadístico	Agua		Triclosán				
	0 g·l ⁻¹	1 g·l ⁻¹	2 g·l ⁻¹	3 g·l ⁻¹	4 g·l ⁻¹	5 g·l ⁻¹	6 g·l ⁻¹
N	10	10	10	10	10	10	10
Mínimo	3.87	4.49	5.16	3.43	2.60	2.77	2.98
Máximo	5.77	5.86	5.84	4.27	5.02	3.71	4.60
Media	4.50	5.02	5.43	3.84	3.55	3.29	3.57
D.E.	0.80	0.52	0.32	0.33	0.94	0.34	0.65

Fuente: elaboración propia

A los 7 días de germinación, la longitud total de la plántula de lechuga en el tratamiento control con agua mostró un crecimiento promedio de 4.50 cm, mientras que las concentraciones más bajas de triclosán con 1 y 2 g·l⁻¹ no mostraron diferencia estadística con el control ($p>0.05$), las concentraciones de 3, 4, 5 y 6 g·l⁻¹ de triclosán si mostraron un efecto inhibitorio de crecimiento de la plántula al ser estadísticamente diferentes al tratamiento control ($p<0.05$) (anexo 6).

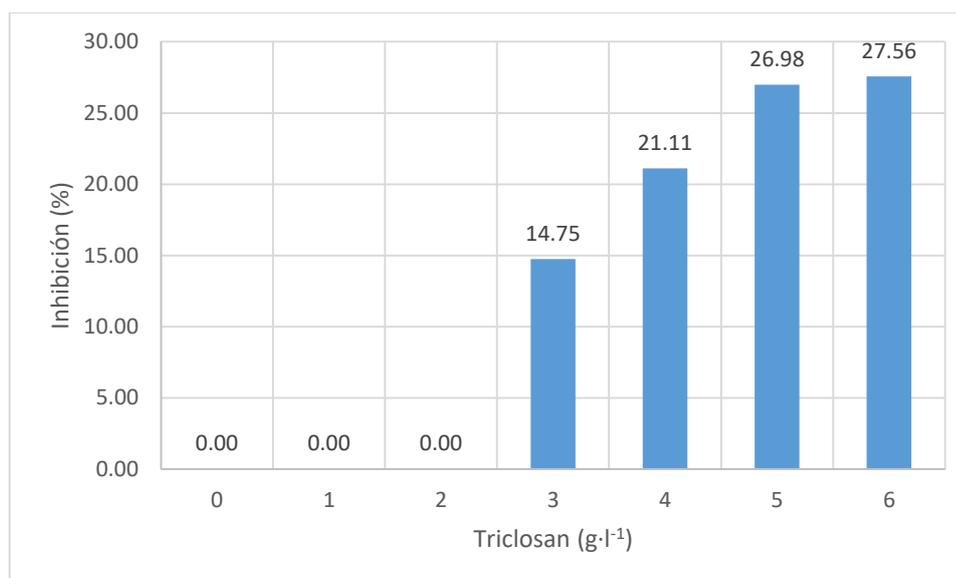


Figura 7. Inhibición porcentual de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición

Evaluando los porcentajes de inhibición, se determinó que en promedio el tratamiento control y las concentraciones de 1 y 2 g·l⁻¹ de triclosán mostraron en promedio 0% de inhibición, es decir el crecimiento fue similar no evidenciándose efecto adverso en estas concentraciones, sin embargo a partir de 3 g·l⁻¹ si se observó efecto inhibitorio con 14.75% y en la concentración más alta se obtuvo un 27.56% de inhibición de crecimiento de la plántula.

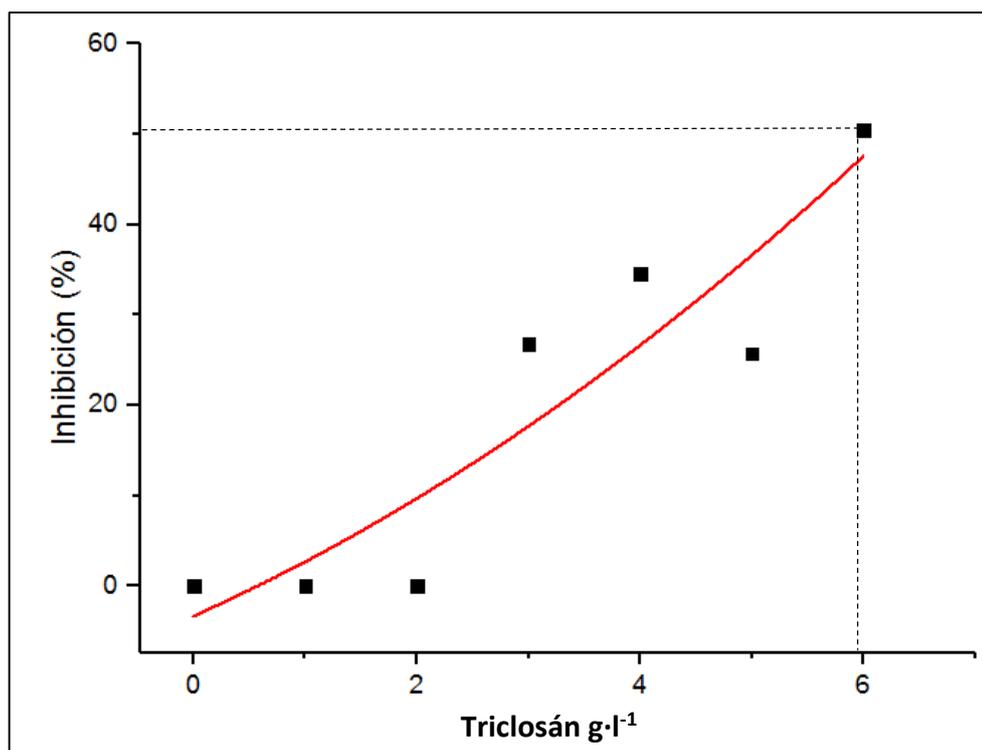


Figura 8. Concentración de Inhibición media (CL₅₀) de crecimiento de plántula como efecto de concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición

Los resultados del bioensayo de toxicidad del triclosán en semillas de lechuga, evidenció que el mayor efecto inhibitorio de crecimiento se manifestó a los 3 días de germinación, mientras que en los días posteriores el crecimiento fue menos inhibido, pero evidenciando un menor diámetro de la plántula. La determinación del efecto inhibitorio medio se estimó ajustando un modelo de regresión no lineal, puesto que el efecto de inhibición es acumulativo y describe una inflexión en las mayores concentraciones de la sustancia tóxica.

Una vez determinado el modelo se procedió a interpolar la concentración con la cual se inhibiría el crecimiento de las plántulas en 50%, este valor se obtendría con la mayor concentración utilizada, es decir 6 g·l⁻¹ de triclosán.

La importancia de determinar el efecto del triclosán sobre la germinación y desarrollo de la lechuga, radica en el posible uso de aguas servidas para el riego de algunos cultivos, por lo que nuestros resultados podrán ser utilizados para planificar dichas actividades.

Los efectos en organismos vegetales ha sido señala por Caamaño (2015), que indica efectos nocivos del triclosán sobre diferentes parámetros relacionados con el

crecimiento de la micro alga de agua dulce *Chlamydomonas moewusii*, como son la densidad celular, la concentración de pigmentos o la actividad celular. El triclosán resultó tóxico para la micro alga a concentraciones iguales o superiores a 0.75 mg·ml⁻¹. Esta toxicidad se ve reflejada en una inhibición del crecimiento, que es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, nuestros resultados coinciden en lo señalado, debido que se observó una inhibición del crecimiento de las plántulas de lechuga, si bien las concentraciones utilizadas no impidieron la germinación de la semilla, queda claro que el crecimiento y probablemente el producto cosechable se vería afectado por la presencia de esta sustancia en el agua de riego.

Del mismo modo el Committee & Safety (2002), señala que las algas parecen ser el organismo acuático más sensible al triclosán, los valores de EC₅₀ para la inhibición de la tasa de crecimiento se han encontrado en el rango de 1.4 a 19 µg/l, cuyos resultados son menores a los reportados en nuestro debido, lo cual se debe a que en el caso de las algas estas están expuesta directamente a la sustancia tóxica, mientras que en el bioensayo de germinación la cubierta germinal protege en cierta medida al embrión de la semilla.

De los resultados del estudio y la revisión realizada, se establece que en organismos vegetales la mayor incidencia del triclosán se presentaría en los niveles primarios de productividad (micro algas y algas), mientras que si se utilizaría para riego el efecto se manifestaría sobre una disminución significativa del desarrollo de las plantas, no descartándose que la productividad de estos cultivos se vea afectada también.

Tabla 10

Análisis de varianza para crecimiento total de raíz de L. sativa sometidas a concentraciones de triclosán a los 7 días de exposición

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-Valor	Pr > F
Concentraciones	6	50.60822667	8.43470444	25.92	<0.0001**
Tiempo de exposición	2	40.3516019	20.175801	62.01	<0.0001**
Error	96	31.2349048	0.3253636		
Total corregido	104	122.194733			

**Diferencia altamente significativa (p<0.01) CV%=16.2

Se observa la existencia de diferencia estadística significativa (p<0.05), de lo cual se interpreta que existió un efecto notorio de las concentraciones de triclosán sobre

el crecimiento de la raíz de *L. sativa*, del mismo modo se evidencia un efecto del tiempo de exposición, las pruebas de rango múltiples se muestran en anexos, de estos resultados es claro el efecto de los dos factores considerados en el estudio.

4.3. Concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre “pulga de agua” (*Daphnia pulex*) y “lechuga” (*Lactuca sativa*) analizada mediante bioensayo.

El efecto adverso no observable se determinó con los resultados de los ítems anteriores, siguiendo un procesamiento estadístico para tal fin, buscando realizar comparaciones pareadas del tratamiento control y cada una de las concentraciones de triclosán utilizadas.

4.3.1. Concentración sin efecto adverso observable (NOAC) de triclosán sobre *Daphnia pulex*

Tabla 11
*Determinación de la concentración sin efecto adverso observable (NOAC) sobre *Daphnia pulex* sometidas a concentraciones de triclosán*

Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo		Sig.
1.1 - 0	9.4000	8.1612	10.6388	***
0.9 - 0	8.8000	7.5612	10.0388	***
0.7 - 0	8.0000	6.7612	9.2388	***
0.5 - 0	7.6000	6.3612	8.8388	***
0.3 - 0	4.8000	3.5612	6.0388	***
0.1 - 0	3.2000	1.9612	4.4388	**

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.

Las comparaciones pareadas con la prueba de Dunnett determinó la existencia de diferencia estadística importante ($p < 0.05$) para todas las concentraciones versus el tratamiento control, excepto para la menor concentración de triclosán con $0.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, de lo cual se interpreta que esta concentración sería la NOAC para esta sustancia bajo las condiciones del estudio.

4.3.2. Concentración sin efecto adverso observable (NOAC) de triclosán sobre *Lactuca sativa*

Tabla 12

Determinación de la concentración sin efecto adverso observable (NOAC) sobre Lactuca sativa sometida a concentraciones de triclosán

Tratamiento Comparación	Diferencia entre medias	Límite de confianza al 95% Simultáneo	Sig.
1 - 0	0.0360	-0.8417	0.9137 n.s
2 - 0	0.0280	-0.8497	0.9057 n.s
5 - 0	-0.8560	-1.7337	0.0217 ***
3 - 0	-0.8940	-1.7717	-0.0163 ***
4 - 0	-1.1520	-2.0297	-0.2743 ***
6 - 0	-1.6780	-2.5557	-0.8003 ***

Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***.

Donde n.s: no significativo

Las comparaciones pareadas con la prueba de Dunnett determinó la existencia de diferencia estadística importante ($p < 0.05$) para las concentraciones de 3, 4, 5, 6 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán, mientras que las concentraciones de 1 y 2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ no mostraron diferencia estadística, de lo cual se interpreta que la NOAC para esta sustancia bajo las condiciones del estudio es de 2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán, con cuya concentración no se produciría algún efecto adverso en el desarrollo de la plántula de lechuga.

Como lo señala Ellis, Revitt, & Lundy, (2013) algunos contaminantes emergentes (PE) ahora están regulados como sustancias peligrosas o prioritarias, el uso excesivo de estas nuevas sustancias requiere estudios específicos a que concentraciones pueden ser tóxicos para diferentes organismos, este estudio trata de tener una primera referencia sobre el triclosán y su efecto, queda claro que los valores de la concentración sin efecto adverso observable (NOAC) reportadas en nuestro estudio deberían tomarse con prudencia, puesto que se requieren estudios de toxicidad crónica para evaluar efectos sobre el crecimiento y desarrollo de ambas especies utilizadas.

Orvos *et al.* (2002), señaló que la concentración efectiva media del triclosán a 48 h para *Daphnia magna* (EC_{50}) fue de 390 $\mu\text{g}/\text{L}$, mientras que la concentración de efecto no observado (NOEC) y la concentración de efecto más bajo observada fue de 34.1 y 71.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ respectivamente, valores que son menores a los reportados a

nuestro estudio, sin embargo queda claro que se requieren estudios específicos para determinar cuál es la concentración de triclosán en las aguas servidas de la ciudad de Puno, lo que permitiría tener una información importante respecto a la letalidad o no de las mismas.

CONCLUSIONES

- La concentración letal media (CL_{50}) del triclosán sobre *Daphnia pulex* (pulga de agua) analizada mediante bioensayo, fue estimada en $0.17938 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán, el intervalo inferior al 95% de confianza es de $0.06036 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y el intervalo superior de $0.28704 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.
- La concentración de inhibición media (CL_{50}) del triclosán sobre plántulas de *Lactuca sativa* (lechuga) analizada mediante bioensayo, fue estimada en $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán.
- La concentración con efecto adverso no observable (NOAC) del triclosán sobre *Daphnia pulex* (pulga de agua) fue estimada en $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, y para *Lactuca sativa* (lechuga) fue estimada en $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de triclosán.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de toxicidad crónica para evaluar los efectos del triclosán sobre aspectos reproductivos y productivos en los organismos de prueba utilizados en el presente estudio.
- Realizar estudios de toxicidad aguda en otros organismos propios del lago Titicaca como larvas de *Orestias* y otras especies, para determinar el efecto tóxico de esta sustancia sobre organismos de mayor nivel trófico.
- Llevar a cabo estudios para analizar el contenido de triclosán en aguas servidas de las principales ciudades de la región Puno, para determinar si dichas concentraciones superan los valores determinados como tóxicos en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Amdany, R., Chimuka, L., & Cukrowska, E. (2014). Determination of naproxen, ibuprofen and triclosán in wastewater using the polar organic chemical integrative sampler (POCIS): A laboratory calibration and field application. *Water SA*, 40(3), 407–414. <https://doi.org/10.4314/wsa.v40i3.3>.
- Assessment, N. I. C. N. and. (2009). Triclosán Priority Existing Chemical Assessment Report. *Assessment*, (30), 1–6.
- Beyond Pesticides. (2011). Triclosán: What the Research Shows. *Food & Waterwatch*, 02-2011(February), 1–4.
- Caamaño, A. (2015). *Toxicidad ejercida por el triclosán sobre la microalga dulceacuícola Chlamydomonas moewusii Gerloff*. (Tesis). Universidad de Coruña, España.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Mexico.
- Chalew, T., & Halden, R. (2009). Environmental Exposure of Aquatic and Terrestrial Biota to Triclosán and Triclocarban. *American Waters Works*, 45(1), 4–13. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2008.00284.x>
- Committee, N. S., & Safety, F. (2002). Risk assessment on the use of triclosán in cosmetics. *Science And Technology*, 04/406-9, 4–6.
- Dinh, A. (2013). Developing a Bioassay for Triclosán Toxicity. *Summer Research Program*, 01, 18.
- Ellis, J., Revitt, D., & Lundy, L. (2013). Behaviour of selected emerging pollutants in stormwater best management practices (BMPs). *Novatech*, 01, 1–10.

- Elmekki, N. (2014). Distribution of triclosán in the environment and its effects on bacterial resistance. *Princeton University, Marine Biological Laboratory, 01*, 1–22.
- Guri, A. (2012). *Triclosán,s Interactions in a Biological Greywater Treatment System* Anne Guri Weihe. Norwegian University.
- Khatikarn, J., Satapornvanit, K., Price, O., & van Den Brink, P. (2016). Effects of triclosán on aquatic invertebrates in tropics and the influence of pH on its toxicity on microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7302-0>.
- Kumar, K., Rohini, P., & Devi, Y. (2015). A Review on Occurrence , Fate and Toxicity of triclosán. *SJIF Impact Factor*, 4(07), 336–369. Retrieved from www.wjpps.com
- Madikizela, L., Muthwa, S., & Chimuka, L. (2014). Determination of Triclosán and Ketoprofen in River Water and Wastewater by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *South African Journal of Chemistry*, 67, 0–0.
- Marques, M., Almeida, F., Filipe, T., Garcia, H., & Rodrigues, J. (2016). Occurrence and risk assessment of parabens and triclosán in surface waters of southern Brazil : a problem of emerging compounds in an emerging country. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 21(3), 603–617.
- Martínez, P. (2014). *Evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica del nonilfenol, triclosán y bisfenol A en Chironomus riparius: identificación y caracterización de biomarcadores moleculares de ecotoxicidad. (Tesis doctoral)*. Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Ministerio de Salud. (2017). *Comunicado de interés público sobre el uso de antibacterianos (triclosán y triclocarbán), como ingredientes utilizados en productos cosméticos*.
- Molina, L. (2014). *Estudio de la degradación de antimicrobianos en agua mediante el tratamiento con radiación ultravioleta. (Tesis)*. Universidad de Jaén.

- Núñez, M., & Hurtado, J. (2005). Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Acute toxicity bioassays using *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) maintained in a modified culture. *Daphnia Magna Rev. Peru. Biol. Rev. Peru. Biol*, 12(121), 165–170. Retrieved from <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Orvos, D., Versteeg, D., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., & Cunningham, V. (2002). Aquatic toxicity of triclosán. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(7), 1338–1349. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210703>.
- Palao, Y. (2017). *Bioensayos de ecotoxicidad aguda de las aguas residuales de la ciudad de Puno sobre Hyalella cuprea (anphípoda: hyalellidae) cultivada en laboratorio*. (Tesis). Universidad Nacional del Altiplano.
- Peña-Álvarez, A., & Castillo-Alanís, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *Tip*, 18(1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.003>.
- Pérez, M., Fernández, P., Peropadre, A., & Hazen, M. (2014). Cytotoxic evaluation of a mixture of eight pollutants at environmental relevant concentrations. *Revista de Toxicología*, 31(2), 172–175. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91932969009>.
- Sandoval, C. (2016). *Determinación de triclosán en tejido vegetal y evaluación de su fracción bioaccesible*. (Tesis). Universidad de Chile.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., & Pillonel, L. (2002). Triclosán: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environmental Science and Technology*, 36(23), 4998–5004. <https://doi.org/10.1021/es025750i>.
- Sobrero, M., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. *Imta*, 55–67. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

- United States Environmental Protection Agency. (2002). US EPA: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. *Environmental Protection*, 232(October), 266. <https://doi.org/Fifth Edition October 2002>.
- United States Environmental Protection Agency. (2006). Reregistration Eligibility Decision for Triclosán. *United States Environmental Protection Agency*, (July), 259. <https://doi.org/EPA738-R-98-010>.
- Vera, M. (2012). *Evaluación del riesgo ambiental por el uso de tres productos químicos de limpieza doméstica*. (Tesis). Universidad Nacional de Trujillo.
- Wilson, B., Smith, V., DeNoyelles, F., & Larive, C. (2003). Effects of Three Pharmaceutical and Personal Care Products on Natural Freshwater Algal Assemblages. *Environ. Sci. Technol*, 37(9), 1713–1719. <https://doi.org/10.1021/es0259741>.



ANEXOS

Anexo 1. Constancia de realización del estudio en Laboratorio de Inculaya, Chucuito



REGION PUNO

GOBIERNO REGIONAL PUNO

Presidencia Regional

Proyecto Especial Truchas Titicaca

"Año del Dialogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE: DIRECTOR EJECUTIVO DEL PROYECTO ESPECIAL TRUCHAS TITICACA – PETT

Hace constar:

Que el Sr. **Edgar Armando Apaza Aguilar** identificado con DNI. **41838738**, ha desarrollado la investigación de **"EFECTO TOXICOLOGICO DEL TRICLOSAN SOBRE *Daphnia pulex* (PULGA DE AGUA) Y *Lactuca sativa* (LECHUGA) MEDIANTE BIOENSAYOS"** el mismo que se desarrolló en los meses de junio, julio y agosto en el laboratorio de Inculaya – chucuito



Se expide el presente a solicitud del interesado, para los fines que vea por conveniente.

Puno, 19 de octubre del 2018



[Handwritten Signature]
LUCIO M. OTAZU ARANA
 DIRECTOR EJECUTIVO

Anexo 2. Constancia de ejecución del estudio en el laboratorio de Ecología Acuática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE ECOLOGÍA
LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE COORDINADOR DE LABORATORIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE ECOLOGÍA ACUÁTICA DE LA UNA-PUNO

HACE CONSTAR:

Que Lic EDGAR ARMANDO APAZA AGUILAR Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Del Altiplano, ha realizado el TRABAJO DE INVESTIGACION “EFECTO TOXICOLÓGICO DEL TRICLOSAN SOBRE *Daphnia pulex* (PULGA DE AGUA) Y *Lactuca sativa* (LECHUGA) MEDIANTE BIOENSAYOS” en la parte de medición y preparación de las diferentes concentraciones con Triclosan, proceso gravimétrico, potenciómetro, oxígeno disuelto y temperatura , Realizado los días 19 al 21 de septiembre del 2018.

Se emite la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime por conveniente

Puno, 19 de Octubre del 2018


Gabino Lorgio Palacios Frisancho
B I O L O G O
C.B.P. Nº 2125

Anexo 3. Resultados del bioensayo de toxicidad de triclosán sobre *Daphnia pulex*

Concentraciones	Individuos	Muertos 6h	Muertos 12h	Muertos 18h
T0	10	1	1	1
T0	10	0	0	0
T0	10	0	0	0
T0	10	0	0	1
T0	10	1	1	1
T1	10	2	4	4
T1	10	1	3	3
T1	10	3	5	5
T1	10	2	4	4
T1	10	1	3	3
T2	10	2	4	6
T2	10	2	4	6
T2	10	1	3	5
T2	10	1	3	5
T2	10	2	4	5
T3	10	3	5	8
T3	10	2	4	8
T3	10	1	3	9
T3	10	2	4	9
T3	10	2	4	7
T4	10	3	5	9
T4	10	3	5	9
T4	10	3	5	10
T4	10	2	4	8
T4	10	2	4	7
T5	10	3	5	9
T5	10	3	5	10
T5	10	2	4	10
T5	10	2	4	9
T5	10	3	5	9
T6	10	3	5	10
T6	10	3	5	10
T6	10	3	5	10
T6	10	2	4	10
T6	10	3	5	10

Anexo 4. Resultados del bioensayo de toxicidad de triclosán sobre *Lactuca sativa*

TRATA	Evaluación a 3 días			Evaluación a 5 días			Evaluación a 7 días		
	LT	LH	LR	LT	LH	LR	LT	LH	LR
T0	3.65	1.98	1.67	3.72	1.62	2.09	4.22	2.12	2.59
T0	3.13	1.86	1.26	3.39	1.46	1.92	3.89	1.96	2.42
T0	3.55	1.82	1.73	3.37	1.71	1.65	3.87	2.21	2.15
T0	3.12	1.50	1.62	4.24	1.63	2.61	4.74	2.13	3.11
T0	3.17	1.30	1.87	5.27	1.79	3.48	5.77	2.29	3.98
T1	3.02	1.26	1.75	4.21	1.55	2.66	4.71	2.05	3.16
T1	3.81	2.01	1.80	5.36	1.99	3.37	5.86	2.49	3.87
T1	3.10	1.85	1.25	4.55	2.35	2.19	5.05	2.85	2.69
T1	3.76	1.61	2.15	3.99	1.83	2.16	4.49	2.33	2.66
T1	3.11	1.63	1.48	4.48	2.05	2.43	4.98	2.55	2.93
T2	3.74	1.73	2.00	4.73	2.01	2.72	5.23	2.51	3.22
T2	3.30	1.47	1.83	5.34	2.46	2.88	5.84	2.96	3.38
T2	3.29	1.60	1.69	4.73	1.95	2.78	5.23	2.45	3.28
T2	3.32	2.07	1.25	5.21	1.92	3.29	5.71	2.42	3.79
T2	3.11	1.55	1.55	4.66	2.08	2.58	5.16	2.58	3.08
T3	2.95	1.62	1.33	3.77	1.55	2.22	4.27	2.05	2.72
T3	2.66	1.11	1.55	2.93	1.37	1.56	3.43	1.87	2.06
T3	2.41	1.32	1.09	3.50	1.33	2.17	4.00	1.83	2.67
T3	2.29	0.96	1.33	3.40	1.45	1.95	3.90	1.95	2.45
T3	1.84	1.02	0.82	3.08	1.60	1.48	3.58	2.10	1.98
T4	2.57	1.30	1.27	2.42	1.07	1.35	2.92	1.57	1.85
T4	3.54	1.58	1.95	3.01	1.02	2.00	3.51	1.52	2.50
T4	1.56	0.98	0.58	3.20	1.00	2.20	3.70	1.50	2.70
T4	1.44	0.99	0.46	4.52	2.32	2.20	5.02	2.82	2.70
T4	1.75	0.86	0.89	2.10	1.11	0.99	2.60	1.61	1.49
T5	3.05	1.27	1.78	2.82	1.28	1.54	3.32	1.78	2.04
T5	2.66	1.39	1.27	2.90	1.15	1.75	3.40	1.65	2.25
T5	1.89	0.98	0.91	3.21	1.38	1.84	3.71	1.88	2.34
T5	2.05	1.07	0.98	2.27	1.09	1.18	2.77	1.59	1.68
T5	2.69	1.61	1.08	2.72	1.23	1.49	3.22	1.73	1.99
T6	1.21	0.63	0.58	2.48	1.22	1.26	2.98	1.72	1.76
T6	1.91	0.66	1.25	3.01	1.53	1.48	3.51	2.03	1.98
T6	0.90	0.46	0.44	4.10	1.64	2.46	4.60	2.14	2.96
T6	2.39	1.26	1.13	3.22	1.68	1.54	3.72	2.18	2.04
T6	1.82	0.87	0.95	2.56	1.16	1.40	3.06	1.66	1.90

Legenda:

LT: Longitud total

LH: Longitud hipocotilo

LR: Longitud radícula

Anexo 5. Resultados de modelo sigmoide con transformación Probit para el ensayo de toxicidad de triclosán sobre *Daphnia pulex*

Probabilidad	dosis	95% Límites fiduciales	
0.01	0.01166	0.0001663	0.04177
0.02	0.01606	0.0003365	0.05164
0.03	0.01968	0.0005258	0.05911
0.04	0.02293	0.0007353	0.06546
0.05	0.02597	0.0009657	0.07114
0.06	0.02887	0.00122	0.07638
0.07	0.03168	0.00149	0.08131
0.08	0.03442	0.00179	0.08601
0.09	0.03712	0.00211	0.09052
0.1	0.0398	0.00246	0.09491
0.15	0.05308	0.0046	0.11561
0.2	0.06673	0.00754	0.13558
0.25	0.08121	0.01151	0.15583
0.3	0.09687	0.01679	0.17704
0.35	0.11407	0.02373	0.19987
0.4	0.1332	0.03284	0.22507
0.45	0.15476	0.04477	0.25364
0.5	0.17938	0.06036	0.28704
0.55	0.20792	0.08071	0.32753
0.6	0.24157	0.10717	0.37894
0.65	0.28209	0.14125	0.44808
0.7	0.33216	0.18445	0.5477
0.75	0.39621	0.23806	0.7029
0.8	0.48218	0.30376	0.96625
0.85	0.60619	0.38624	1.46293
0.9	0.8085	0.50008	2.57609
0.91	0.86674	0.52972	2.96754
0.92	0.93478	0.56306	3.46579
0.93	1.01576	0.6012	4.11715
0.94	1.11454	0.64581	4.99851
0.95	1.23896	0.69952	6.24709
0.96	1.403	0.76687	8.13371
0.97	1.63473	0.85667	11.27656
0.98	2.00307	0.98959	17.46136
0.99	2.75924	1.23618	34.95378

Anexo 6. Resultados de análisis estadístico

Análisis de varianza para mortalidad de *D. pulex*

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-Valor	Pr > F
Concentraciones	6	8.48682253	1.41447042	44.76	<.0001**
Tiempo de exposición	2	12.1773395	6.08866977	192.69	<.0001**
Error	96	3.03341335	0.03159806		
Total corregido	104	23.6975754			

Y=Log (y+5)

**Diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) CV%=7.5

Prueba de rango múltiple de Tukey por concentraciones para mortalidad de *D. pulex*

Tukey Agrupamiento	Media	N	Concentraciones
A	2.56841	15	T6
A	2.54571	15	T5
B	2.52589	15	T4
B	2.48827	15	T3
B	2.38980	15	T2
B	2.34219	15	T1
C	1.69452	15	T0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Prueba de rango múltiple de Tukey por tiempo de exposición para mortalidad de *D. pulex*

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo de exposición
A	2.76414	35	12 horas
B	2.39875	35	18 horas
C	1.93202	35	6 horas

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Análisis de varianza para crecimiento total de raíz de *L. sativa*

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F-Valor	Pr > F
Concentraciones	6	50.60822667	8.43470444	25.92	<.0001**
Tiempo de exposición	2	40.3516019	20.175801	62.01	<.0001**
Error	96	31.2349048	0.3253636		
Total corregido	104	122.194733			

**Diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) CV%=16.2

Prueba de rango múltiple de Tukey por concentraciones para crecimiento total de raíz de *L. sativa*

Tukey Agrupamiento		Media	N	Concentraciones
	A	4.5733	15	T2
B	A	4.2987	15	T1
B		3.9400	15	T0
	C	3.2007	15	T3
	C	2.9240	15	T4
	C	2.8453	15	T5
	C	2.7647	15	T6

Prueba de rango múltiple de Tukey por tiempo de exposición para crecimiento total de raíz de *L. sativa*

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tiempo de exposición
A	4.1706	35	7 días
B	3.6706	35	5 días
C	2.6789	35	3 días

A los 3 días de evaluación

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento		Media	N	tratamiento
	A	3.3600	5	1
	A	3.3520	5	2
	A	3.3240	5	0
B	A	2.4680	5	5
B	A	2.4300	5	3
B		2.1720	5	4
B		1.6460	5	6

A los 5 días de evaluación

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.					
Tukey Agrupamiento		Media	N	tratamiento	
	A	4.9340	5	2	
B	A	4.5180	5	1	
B	A	C	3.9980	5	0
B	D	C	3.3360	5	3
	D	C	3.0740	5	6
	D	C	3.0500	5	4
	D		2.7840	5	5

A los 7 días de evaluación

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.					
Tukey Agrupamiento			Media	N	tratamiento
	A		5.4340	5	2
B	A		5.0180	5	1
B	A	C	4.4980	5	0
B	D	C	3.8360	5	3
	D	C	3.5740	5	6
	D	C	3.5500	5	4
	D		3.2840	5	5

Anexo 7. Panel fotográfico

Bioensayo con pulga de agua (*Daphnia pulex*)



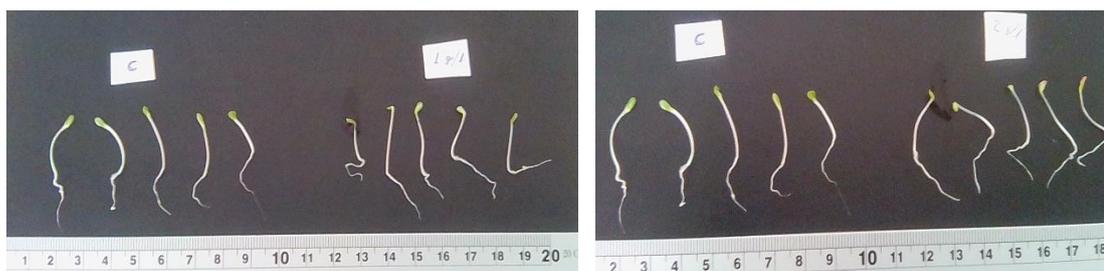
Figura 9. Procedimiento de ejecución del bioensayo con *Daphnia pulex*

Bioensayo con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)



Figura 10. Procedimiento de ejecución del bioensayo con *Lactuca sativa*

Medición de plántulas de lechuga



Control y 1 g·l⁻¹ de triclosán

Control y 2 g·l⁻¹ de triclosán



Control y 3 g·l⁻¹ de triclosán

Control y 4 g·l⁻¹ de triclosán



Control y 5 g·l⁻¹ de triclosán

Control y 6 g·l⁻¹ de triclosán

Figura 11. Efecto de concentraciones de triclosán versus tratamiento control en el desarrollo de plántulas de lechuga.