PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación toxicológica y teratológica de xantatos de uso industrial utilizando embriones de pez cebra (*Danio rerio*).

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

Estibaliz Maitea Villaverde Gómez

Quito, 2023

A mi familia y amigos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han apoyado en mi camino hacia la finalización de esta tesis. En primer lugar, quiero agradecer a mis padres y hermanos por su amor incondicional y su apoyo constante durante todo este tiempo. Gracias por ser mi mayor motivación y por darme la fuerza para seguir adelante.

También quiero agradecer a mi tutor Andrés, por su paciencia, guía y sabiduría a lo largo de este proceso. Gracias por su compromiso y dedicación para ayudarme a alcanzar mis metas académicas.

Asimismo, quiero agradecer a mi amiga Daniela, quien siempre estuvo ahí para escucharme y brindarme su apoyo emocional. Gracias por ser una persona tan especial en mi vida y por acompañarme en este viaje.

Finalmente, quiero agradecer a Marcelo, quien me brindó su apoyo y motivación incondicional durante toda mi carrera. Gracias por ser mi fuente de inspiración y por motivarme a ser mejor cada día.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN....1
2. ABSTRACT....2
3. INTRODUCCIÓN....3
3.1. OBJETIVOS....5
3.1.1. OBJETIVO GENERAL....5
3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS....5
4. MATERIALES Y MÉTODOS....6
4.1. CUIDADO Y MANTENIIENTO DE PECES CEBRA....6
4.2. REPRODUCCIÓN....7
4.3. PRUEBAS TERATOLÓGICAS....7
4.4. PRUEBAS TOXICOLÓGICAS....8
ANÁLISIS ESTADÍSTICO....8
4.5. MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA CELULAR....9
5. RESULTADOS....9
5.1. PRUEBAS TOXICOLÓGICAS....9
5.2. NARANJA DE ACRIDINA....10
5.3. PRUEBAS TERATOGÉNICAS....10
6. DISCUSIÓN....12
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....15
8. FIGURAS....18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de mortalidad del xantato en cada una de las concentraciones las primeras 24 horas del tratamiento. 18
Figura 2. Porcentaje de mortalidad del xantato en cada una de las concentraciones a las 48 horas del tratamiento. 18
Figura 3. Porcentaje de mortalidad del xantato en cada una de las concentraciones a las 72 horas del tratamiento. 19
Figura 4. Tincion naranja de acridina, Fluorescencia en bulbos olfatorios, corazón, yema e intestinos de un embrión experimentado con xantato a una concentración de 20 mg/L. 19
Figura 5. Tinción Naranja de acridina en ensayo toxicológico de alevines con 5 días post-fertilización. 20
Figura 6. Medidas de CTCF (fluorescencia celular total corregida) promedios obtenidos de cada grupo de alevines por concentración. 20
Figura 7. Comparación de un embrión de desarrollo normal (A), con un embrión expuesto a xantato amílico de potasio en 24 mg/L los puntos señalan como se midió el área de corazón y yema en cada embrión (B) 21
Figura 8. Comparación de embriones expuestos al xantato amílico de potasio. 22
Figura 9. EC 50 del porcentaje de eclosionados en cada concentración de experimentación en teratogénesis. 23
Figura 10. Comparación del tamaño del área pericárdica en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. 23
Figura 11. Comparación del tamaño de las yemas en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. 24
Figura 12. Comparación del tamaño de cabezas en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. 24
Figura 13. Comparación del tamaño del tórax en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. 25
Figura 14. Comparación del tamaño de colas en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. 25

1. RESUMEN

Los xantatos (XT) son un reactivo de flotación orgánico común compuestos de sales organosulfuradas, utilizadas para la flotación de minerales sulfurados y algunos minerales de óxido debido a su alta eficiencia y bajo costo. La flotación es un proceso de separación de minerales aplicado en minería, en el que los depuradores son los principales reactivos. Previamente se ha catalogado al XT como un componente tóxico para los ecosistemas y la salud humana, se estima que su consumo industrial anual en el mundo superará los 3,7 millones de toneladas en 2025. Este proyecto, tiene como objetivo analizar el efecto del xantato amílico de potasio en larvas y embriones de pez cebra. Se realizaron diferentes ensayos de teratogénesis y toxicología para ver lo efectos en embriones de 3 horas después de la fertilización (3hpf) y en alevines de 5 días (5dpf), en los cuales se diluía un granulo de XT a diferentes concentraciones en medio E2 para registrar sus efectos. Los resultados obtenidos marcaron que los XT provocan un retraso en el desarrollo embrionario dependiendo de la concentración preparada, además que en alevines después de 72 horas existe una concentración letal de 54,88 mg/L, siendo así menor a la previamente registrada por la literatura en trucha arcoíris. En los análisis estadísticos al comparar los efectos de cada concentración con el grupo control obtenemos que las diferencias de los embriones tratados con XT con los controles son estadísticamente significativas, demostrando que efectivamente existe un retraso en el desarrollo de embriones expuestos al xantato amílico de potasio, por lo que se puede concluir es un químico altamente tóxico que causa mortalidad en pez cebra, además, de efectos teratogénicos que modifican el desarrollo normal de estos vertebrados acuáticos, que se intensifica a medida que se aumenta la concentración y tiempo de exposición en tratamientos.

Palabras clave: LC 50, Peces cebra, Teratogénesis, Toxicología, Xantatos.

2. ABSTRACT

Xanthates (XT) are a standard organic flotation reagent composed of organosulfur salts, used for the flotation of sulfide minerals and some oxide minerals due to their high efficiency and low cost. Flotation is a mineral separation process applied in mining, in which scavengers are the primary reagents. XT has been previously cataloged as a toxic component for ecosystems and human health, and it is estimated that its annual industrial consumption in the world will exceed 3.7 million tons in 2025. For this study, zebrafish were chosen as the aquatic model species for developmental toxicity analysis. Different tests of teratogenesis and toxicology were carried out to see the effects in embryos 3 hours after fertilization (3hpf) and in 5-day-old fry (5dpf), in which a granule of XT was diluted at different concentrations in an E2 medium to register its effects. The results showed that XT causes a delay in embryonic development depending on the concentration prepared. In fry after 72 hours, there is a lethal concentration of 54.88 mg/L, lower than previously recorded in the literature on rainbow trout. In the statistical analysis, when comparing the effects of each concentration with the control group, the results show that the differences between the embryos treated with XT with the controls are statistically significant, demonstrating that there is indeed a delay in the development of embryos exposed to potassium amyl xanthate, so it can be concluded that it is a highly toxic chemical that causes mortality in zebrafish, besides teratogenic effects that modify the normal development of these aquatic vertebrates, which intensifies as the concentration and time of exposure in treatments increase.

Keywords: LC50, Teratogenesis, Toxicology, Xanthates, Zebrafish.

3. INTRODUCCIÓN

Los xantatos son un tipo común de reactivos de flotación orgánicos. Se trata de sales organosulfuradas que se utilizan en la flotación de minerales sulfurados y algunos oxidados debido a su eficacia y bajo costo (Qiao et al., 2023). La flotación es un proceso mediante el cual se liberan minerales. Los reactivos principales son los colectores, ya que pueden absorberse selectivamente en la superficie de los minerales para hacerlos hidrofóbicos. Los xantatos son, con mucho, los colectores más efectivos y utilizados a nivel global. Su consumo suele oscilar entre 30 y 300 g/t de mineral en cada planta de flotación (Rezaei et al., 2018). Se estima que el consumo anual de xantatos en la industria llegará a superar los 3700.000 toneladas para 2025 (Amrollahi et al., 2019). Además, según estudios se dio a conocer que en cada tratamiento solo se utiliza aproximadamente la mitad de los xantatos añadidos a los diferentes circuitos de flotación, el resto de xantatos residuales se liberan en relaves afluentes (Fu et al., 2020). Las aguas residuales producto de la flotación de minerales son peligros potenciales para la salud de los seres humanos, animales y ecosistemas naturales (Fu et al., 2020). Los productos más peligrosos de la descomposición del xantato en agua son bisulfuro de carbonato, alcohol amílico y la potasa cáusica todos perjudiciales para la salud (Prudence et al., 2022). Para cumplir las normas de vertido y protección ecológica es muy importante conocer los efectos nocivos de los xantatos e investigar formas de tratamiento de aguas residuales. Existen estudios que han notificado los efectos tóxicos de los xantatos en algas microscópicas (Donoghue, 1998). Un ejemplo es el experimento realizado con *Chlorella pyrenoidosa* en el cual se demostró que el xantato de butilo indujo toxicidad dependiente de la dosis ya que altera sus funciones metabólicas normales provocando cambios en actividad enzimática interna que afecta a su crecimiento y desarrollo (Li et al., 2021).

También existen reportes del uso de xantatos triciclodecan-9-ilo y ciclododecilo para probar sus efectos antitumorales en algunos tipos de cánceres como melanoma maligno (HTB72), cérvix carcinomas (Hela) y fibroblastos, debido a que causan muerte celular en ensayos in vitro e in vivo (Amtmann y Sauer, 1987). Sin embargo, aún no se han investigado los mecanismos específicos que median la toxicidad en la etapa de desarrollo en vertebrados. En un estudio realizado por Schick (1989), se ha probado un compuesto de xantato

(triciclodecan-9-il-xantogenato) para tratar la leucemia linfoide en ratones utilizando dosis 10% menores a la letal suministrados de forma intraperitoneal, sin embargo, los estudios concluyen que no existieron efectos terapéuticos significativos en los tumores de ratón o leucemias in vivo.

El pez cebra es una de las especies más utilizadas para evaluar y determinar toxicidad aguda de contaminantes ambientales (Horzmann y Freeman, 2018). Es ampliamente utilizado para investigar el desarrollo embrionario y es aplicado en las áreas de teratología y toxicología, por las siguientes ventajas: fácil mantenimiento, alta fecundidad, embriones transparentes, desarrollo embrionario rápido, y la extensa documentación detallada con puntos de referencia disponibles (Ping et al., 2022). Además, se consideran una alternativa a la experimentación con otros modelos más vulnerables, como los mamíferos. El pez cebra es uno de los modelos que ofrece resultados de forma precisa y similares a las condiciones humanas (Polaka et al., 2022).

Muchos experimentos con embriones de *Danio rerio* implican el uso de larvas para demostrar la toxicidad de compuestos de uso industrial. Las distintas aplicaciones de los embriones de pez cebra lo han convertido en un modelo adecuado para nuevos estudios enfocados en la ecotoxicidad, los cuales incluyen evaluaciones de diferentes químicos como sedimentos y plaguicidas. Las ventajas aquí incluyen la detección de alto rendimiento (efecto en población) y análisis a pequeña escala (estudios en tejidos), las cuales son características importantes en el desarrollo de fármacos y diferentes compuestos de uso industrial (Busch et al., 2011). Sin embargo, se sabe que algunos tóxicos requieren de una previa activación hepática para liberar su toxicidad total, lo que permite cuantificar los efectos en los embriones. Los embriones de pez cebra en sus primeras etapas pueden tener una capacidad limitante en este ámbito. No obstante, un estudio realizado por S. Weigt (2011) demostró que el pez cebra era capaz de activar metabólicamente 10 protoxicantes diferentes a través de varias vías metabólicas en las etapas posteriores a la eclosión, lo que lo convierte en un modelo ideal para el estudio de la toxicidad con xantatos.

Para probar la muerte celular causada por los xantatos utilizamos tinción con naranja de acridina. El colorante naranja de acridina (NA) es un tipo de tinción vital clasificado como un fluorocromo especial que se une al ácido nucleido de las células haciendo que se intercalen

para modificar sus características ópticas, esto permite distinguir diferentes tipos de células como células bacterianas de glóbulos blancos ya que el cambio en las longitudes de onda junto a la excitación las teñirá de color naranja (Forbes, 2009).

Las células que sufren previa permeabilización y las apoptóticas experimentan una pérdida de la compartimentación del pH haciendo que el naranja de acridina se filtre de los lisosomas ácidos y se unan de forma difusa a las moléculas de ARN y ADN, lo que resulta en la coloración amarillo- naranja en toda la célula (Kusuzaki et al., 2012). Durante la apoptosis las células que fueron teñidas con naranja de acridina muestran señales de contracción celular, fragmentación celular y perdida de la demarcación celular, eventualmente, el ARN celular junto a la emisión de NA rojizo se pierden, mientras el núcleo permanece de forma fragmentada. Por otra parte, durante la necrosis, la fluorescencia naranja de los lisosomas desaparece debido a su disrupción y a la pérdida del ARN celular, mientras que la señal de los núcleos lisos y los contraídos permanece de color verde (Byvaltsev et al., 2019).

Este proyecto se llevó a cabo en colaboración con la Escuela Politécnica Nacional, para analizar los impactos de la contaminación por xantatos en una zona minera de Portovelo-Zaruma en la cuenca del río Puyango. Esta zona es de gran importancia por ser fronteriza con el Perú, donde el río Puyango arrastra contaminantes producto de las actividades mineras en territorio nacional hasta territorio peruano. En este estudio se seleccionó al pez cebra como especie modelo acuática para investigar la toxicidad de los XT en el desarrollo. Los resultados de estos experimentos serán tomados en cuenta para diseñar proyectos de remediación y restauración ambiental.

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos toxicológicos y teratológicos del xantato amílico de potasio utilizado en la zona minera de Portovelo-Zaruma en el cantón Ponce Enriquez, en embriones de peces cebra (*Danio rerio*).

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Exponer a los embriones de pez cebra desde su primer día de fertilización al xantato amílico de potasio para las pruebas teratológicas.

- Evaluar distintas concentraciones para calcular la letalidad media del xantato amílico de potasio.
- Utilizar naranja de acridina para visualizar los efectos del xantato a nivel celular.
- Exponer a los alevines de pez cebra al xantato después de los cinco días de fertilización para las pruebas toxicológicas.
- Fijar los embriones de pez cebra para su preservación
- Documentar fotográficamente los resultados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los embriones usados en esta investigación fueron donados por el laboratorio de biología del desarrollo de la PUCE. La muestra de xantato amílico de potasio fue obtenido en colaboración con el proyecto INEDITA del PNUD.

4.1. CUIDADO Y MANTENIIENTO DE PECES CEBRA

El sistema de cría de los peces cebra se llevó a cabo en base a Lawrence, (2007) en el cual se adaptaron los estanques y el espacio físico a 28 ºC para simular su hábitat natural. También cuenta con un sistema de luces automáticas cronometradas que se prendieron a las 7h30 y se apagaron a las 18h30. El agua (municipal) usada en los acuarios pasó por un proceso de tratado antes de entrar en contacto con los peces, el cual consistió en llenar dos estanques vacíos de 250 L con agua hasta el tope, seguidamente se agregó 5 mL de declorador (BioBlO Special Care Safe Water) y también 5 gotas de azul de metileno 0,1%, la mezcla pasó en reposo durante 24. Los peces fueron alimentados dos veces al día con alimento granulado (Tropical NANOVIT GRANULAT) en la mañana, la cual fue molida en un mortero y artemia (Artemia Mackay Marine) en la tarde, previo a suministrarla esta pasó por un proceso de filtrado con agua declorada hasta bajar su concentración salina. Para la preparación de artemia se usó 20gr de sal marina con agua de pecera limpia preparada de acuerdo con el paso anterior, se agitó hasta disolver la sal y finalmente se agregó 1gr de artemia, los frascos preparados se encontraban conectados a aireadores y se los dejó en la misma habitación aclimatada con calefacción por 24 horas hasta su eclosión. El fondo de cada uno de los estanques fue limpiado todos los días y una vez a la semana se realizó una

limpieza total con esponja para remover acumulaciones de algas en los mismos (Chaves et al., 2020).

4.2. REPRODUCCIÓN

Se colocaron peces adultos de cinco meses en adelante en acuarios de desove (aquaneraing) sin aireadores con placas perforadas en la parte inferior para la recolección de embriones. Los peces fueron repartidos en proporción 2:3 (hembras: machos). Las luces se prendieron a las 7h30 de la mañana siguiente para estimular el apareamiento y desove, después de dos horas se recolectaron los embriones con pipetas pasteur y se los transfirió a cajas petri con medio E2 (1,5M NaCl, 50 mM KCl, 100 mM $MgSO_4$, 15 mM KH_2PO_4, 750 mM KH_2PO_4, 210 mM Na_2HPO_4, 500 mM $Cacl_2$-$2H_2O$, 350mM NaHCO3, 0.1 % azul de metileno). A continuación, se los analizó en el estereoscopio (Olympus, SDF PLALP 1XPF. JAPAN.) para descartar aquellos no fecundados o con malformaciones y se llevaron a la incubadora a 28ºC para usarlos después de 3 horas (teratogénesis) o después de 5 días (toxicidad).

4.3. PRUEBAS TERATOLÓGICAS

Los granos de xantatos fueron diluidos en medio E2 sin azul de metileno para hacer las soluciones de exposición (12, 24, 36,48 y 60 mg/L). Los embriones de pez cebra de 3 a 5 horas después de la fertilización (5hdf) del mismo acuario fueron expuestos a las diferentes concentraciones y al medio de control (E2). Para cada lote se seleccionaron 12 embriones al azar que fueron distribuidos en una placa de 24 pocillos (Costar 24-Well Cell Culture Cluster), junto a 2 mL de medio de exposición por pocillo. Se realizaron cuatro réplicas (N=4) para cada tratamiento y los embriones de cada réplica se seleccionaron al azar. Las placas de tratamiento fueron dejadas en incubación a 28 ºC y después de 3 días de exposición al tratamiento, los embriones fueron fijados en PFA al 4% durante dos horas y posteriormente almacenados en solución PBS 1x. Finalmente, los resultados fueron observados en el estereoscopio y documentados fotográficamente.

4.4. PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

Al igual que las pruebas teratológicas los granos de xantatos fueron diluidos en medio E2 para hacer las soluciones de exposición (20, 40, 60, 80 y 100mg/L). Se utilizaron alevines de pez cebra de cinco días posterior a la fertilización (5dpf) del mismo acuario que fueron expuestos a las diferentes concentraciones. Para cada lote se seleccionaron 10 embriones al azar que fueron distribuidos en una placa de 24 pocillos, junto a 2mL de medio de exposición. Por cada experimentación se realizaron cuatro réplicas (N=4) la mortalidad de cada concentración se fue contabilizando a las 24, 48 y 72 horas de cuerdo a los establecido en los controles de pruebas. Cada día los embriones fueron fijados en PFA al 4% durante dos horas y posteriormente almacenados en solución PBS 1x.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los índices de mortalidad media (LC 50) se calcularon usando el programa R studio, realizando un análisis de dos variables para los ensayos, en el caso de los ensayos de toxicidad se utilizaron las variables (concentración) y (mortalidad). Para los ensayos de teratogénesis se realizó un EC50, los parámetros utilizados fueron los porcentajes de eclosión por cada concentración.

En estos ensayos los análisis de LC 50 y EC 50 se realizaron de acuerdo con Castillo (2004), donde se usan los resultados de cada concentración y los valores de los ensayos se van agregando como puntos a la gráfica, la variable independiente (concentración del tóxico) se ubica en el eje "X" y la variable dependiente (respuesta=mortalidad o % de eclosión) en el eje de las "Y" con estas variables se calculan los valores límite (superior e inferior) que define los intervalos de 95 % de confianza. Los valores límite superior e inferior se obtienen cuando se adiciona o sustrae del promedio respectivamente dos desviaciones estándar de acuerdo con: concentración límite superior: promedio + 2σ, concentración límite inferior: promedio $-2\ \sigma$.

Las medidas del saco de yema de los embriones de 3dpf utilizados en los ensayos de teratogénesis se midieron usando el programa Image J, tomando como referencia el grupo control. El las cuales se media el área de la cavidad pericárdica y yemas junto a las longitudes de la cabeza, tórax y cola en vista lateral (Fig. 7). Así mismo se realizó un ANOVA por cada medida previamente mencionada vs la concentración. Estas medidas de cada ensayo fueron

recopiladas en Excel para su procesamiento en R studio.

4.5. MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA CELULAR

La determinación de la fluorescencia celular a partir de las imágenes de microscopía se procesó con Image J. En este proceso se tomó en cuenta la intensidad de área integrada (RawIntDen) y el valor medio de gris (Mean) y el área. Para seleccionar el embrión fluorescente sobre un fondo oscuro, se usó la herramienta "selección de polígonos". Posteriormente, las medidas obtenidas de Image J se pasaron a Excel para calcular el CTCF (fluorescencia celular total corregida).
La fórmula para calcular el CTCF es: Densidad integrada – (Área de la celda seleccionada x Medios de fluorescencia de las lecturas de fondo).

5. RESULTADOS

5.1. PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

Los alevines de pez cebra de 5 días (5dpf) presentan alta sensibilidad a la presencia de xantato. En esta experimentación, se comprobó que estos se vieron afectados dependiendo de la concentración del XT en el medio E2. En estos ensayos, se obtuvo la concentración letal de cada día de experimentación: en las primeras 24 horas se obtuvo una concentración letal de 98,28 mg/L, con un margen de 83,399 y 103,45 mg/L (Fig. 1). Durante este periodo de exposición de las larvas a las soluciones, se vieron afectados principalmente aquellas con las concentraciones más altas, por lo que la concentración letal se encuentra en concentraciones entre 80 y 100 mg/L, con una mortalidad en un rango del 20% al 86,6% en 100 mg/L, mientras que 80 mg/L tiene una mortalidad que va del 6,6% al 50%. El resto de las concentraciones no presentan mortalidad en el primer día.

A las 48 horas de exposición se encontró que la concentración letal es de 65,79 mg/L, con un margen de 61,3 y 70,28 mg/L. Durante estas 48 horas, la exposición al XT comenzó a afectar también a las larvas de las concentraciones bajas, lo que se ve en la escala de letalidad (Fig. 2). A partir del segundo día, se observa que la concentración de 100 mg/L tiene un 100% de mortalidad; 80 mg/L tiene una mortalidad que va del 40% al 100%; y la

concentración de 60 mg/L tiene una mortalidad del 6,6% al 13,3%. Las concentraciones de 40 mg/L y 20 mg/L presentan un 0% de mortalidad.

A las 72 horas, la concentración letal es de 54,88 mg/L, con un margen de 49,53 y 60,23 mg/L (Fig. 3), lo que evidencia que a medida que aumenta el tiempo de exposición a las diferentes concentraciones de xantatos, se requiere una concentración menor para provocar una letalidad significativa en los alevines de pez cebra. Es a partir de las 72 horas que las concentraciones más altas correspondientes a 100 y 80 mg/L tienen una mortalidad del 100%. La concentración de 60 mg/L tiene una mortalidad que va desde el 37,5% hasta el 93,3%; la concentración de 40 mg/L tiene una mortalidad que va del 0% al 25%, y finalmente, la concentración más baja no presenta mortalidad a las 72 horas (Fig. 3). A partir del tercer día, los rangos porcentuales de mortalidad en cada concentración dejan de ser tan variables como se observa en las primeras 24 y 48 horas.

5.2. NARANJA DE ACRIDINA

Los resultados obtenidos en las pruebas toxicológicas se confirman en las evaluaciones con naranja de acridina, que registró las células más afectadas en las larvas con exposición al xantato amílico de potasio. Las imágenes junto al cálculo del CTCF (fluorescencia celular total corregida) demuestran que existe una clara afección de los embriones en bulbos olfatorios, cavidad pericárdica, masa de yema e intestinos (Fig. 4). En estos resultados se puede ver como a partir del control la fluorescencia en las concentraciones de 20 y 40 mg/L aumentan, mientras las concentraciones de 60, 80 y 100 mg/L existe una disminución en la fluorescencia (Fig. 6). Lo cual se puede apreciar en la comparación de los alevines experimentados en cada concentración con un notable aumento de fluorescencia en las primeras concentraciones de 20 y 40 mg/L, seguido de una disminución en las concentraciones de 60, 80 y 100 mg/L (Fig. 5).

5.3. PRUEBAS TERATOGÉNICAS

En cuanto a los resultados de teratogénesis se puede observar una clara afectación al desarrollo de los embriones en cada una de las concentraciones de xantatos. Se observa

que los órganos y zonas más afectadas de los embriones son el área pericárdica y yema, causando así edemas y desarrollo retardado en estas áreas (Fig. 8). A medida que aumenta la concentración de XT por solución, aumenta el tamaño del edema en el corazón y de yemas, como se observa en el promedio total de las medidas por área (μm^2) (Fig. 10 y 11). Del mismo modo, las concentraciones mayores a 12 mg/L de XT ocasionan una clara disminución del tamaño de los embriones, ya que el aumento de concentración provoca que las longitudes de la cabeza, tórax y cola son notablemente más pequeñas en cada concentración en comparación con el grupo control (Fig. 12, 13 y 14). Así mismo, se aprecia una disminución sucesiva de la pigmentación de los embriones con cada concentración, mientras mayor sea la concentración menor la pigmentación desarrollada en el embrión. Lo que sugiere que el xantato amílico de potasio retrasa el desarrollo embrionario, por lo que se observa tanto en tamaño longitudinal como en las áreas medidas.

En los análisis ANOVA al comparar los efectos de cada concentración con el grupo control obtenemos un valor de P menor a 0,05 lo cual nos indica que existe un efecto en el desarrollo del corazón dependiendo de cada concentración de tratamiento, a medida que aumenta la concentración aumenta el tamaño del edema. Resultado similar se observa con el tamaño de las yemas en embriones se obtiene $p \leq 0,05$ lo que nos muestra que las diferencias de medidas entre concentraciones son estadísticamente significativas siendo más grandes a medida que aumenta la concentración, indicando su poca absorción durante el desarrollo. En cuanto a las longitudes los resultados obtenidos muestran que en todas $p \leq 0,05$, lo que resalta lo previamente mencionado que las diferencias de longitudes de los embriones tratados en cada concentración son menores que el grupo control (Fig. 12, 13 y 14).

Por otro lado, los porcentajes de eclosión de larvas también se ven afectadas ya que solo los embriones expuestos a la concentración más baja de 12 mg/L logran eclosionar, con porcentajes de eclosión que van del 20 al 40%, lo cual son relativamente bajos, las demás concentraciones (24, 36, 48 y 60 mg/L) presentan un 0% de embriones eclosionados en la experimentación. El valor de EC 50 (Dosis efectiva) obtenido de cada concentración vs el porcentaje de eclosión es de 11,12 mg/L, un valor aún más bajo que la menor

concentración utilizada en los ensayos de teratogénesis, con un límite inferior de -16,52 y superior de 38,78 mg/L (Fig. 9).

6. DISCUSIÓN

Los ensayos de toxicidad y letalidad con xantatos amílicos de potasio demuestran que ciertas concentraciones de estos compuestos son perjudiciales para larvas de peces cebra en 5 días post fertilización (dpf). La concentración letal indica que en 54.88 mg/L existe una letalidad del 50 % de los individuos tratados a las 72 horas de exposición, siendo así, menor a la reportada en ensayos hechos con la trucha arcoíris (*Salmo Girdneri*) de 56 mg/L a lo largo de 28 días, también se señala que en comparación con los xantatos hechos a base de sodio, los compuestos de amílicos de potasio son más tóxicos (Webb, M., Ruber, y Leduc, 1976). Cabe recalcar que los ensayos en trucha arcoíris eran desarrollados en adultos, a diferencia de estos ensayos realizados en larvas, lo cual puede influir también en la diferencia significativa de ambas LC 50, que además sugiere que las larvas de pez cebra presentan menos resistencia a estos compuestos. En comparación con otras especies el valor de la concentración letal media puede ser mayor o menor dependiendo del estadio de desarrollo y las características fisiológicas de cada especie (Alto, K. et al., 1977; Li et al., 2021).

Existen pocos datos registrados sobre la toxicidad de este tipo de xantato en específico y en su mayoría se desconoce sobre el LC 50 en otras especies de peces. En humanos, por el contrario, se lo ha catalogado como causante de efectos adversos como lo son envenenamiento por ingestión (hepatotoxicidad ocupacional), quemaduras en la piel (dermatotoxicidad), e inflamación de pulmones provocada por inhalación de gases (neumonitis toxica), también hay otros datos obtenidos en ratones se obtuvo un LD 50 (Dosis letal media) de 99 mg/kg en experimentación intravenosa, como la única referencia de pruebas toxicológicas con mamíferos (Sasseville et al., 2003). En cuanto a su ecotoxicidad el tema aún es poco explorado en la comunidad científica a pesar de su importancia industrial la única información que se conoce es la proporcionada por los fabricantes, en el caso del xantato amílico de potasio por Alfa Aesar y Central Drug House de India (revisada en 2006) en los cuales se los marca como “desconocido” o “sin datos disponibles” , según estas fichas

los productos más peligrosos de la descomposición del xantato son bisulfuro de carbonato, alcohol amílico y la potasa cáusica todos perjudiciales para la salud (Prudence et al., 2022).

Los valores obtenidos de cada LC50 de 24 horas de experimentación nos dan 98,28 mg/L con un rango inferior de 89,14 y superior de 107,41. Mientras que, a las 48 horas, los límites son de 61.30 y 70.28 con un LC50 de 65.79 mg/L. Al tercer día, los intervalos se establecieron en 49.53 y 60.23 y un LC50 de 54.88 mg/L. Estos valores establecen que la fiabilidad de los resultados obtenidos de este LC50 es del 95%. Sin embargo, los ensayos de la concentración letal en cada día muestran diferencias en cuanto al error estándar. En las primeras 24 horas se obtuvo una letalidad de 98,28 mg/L con un error estándar de 4,54. En las siguientes 48 horas, el error marcado es de 2.23 y las 72 horas es de 2.66. Esto evidencia la variabilidad de resultados cada día de experimentación, lo que sugiere que al segundo y tercer día la variación entre ensayos está disminuyendo de forma notoria y los resultados tienen rangos más estrechos. Por lo que se sugiere que los valores adecuados para la obtención del LC50 más exactos sean a las 48 y 72 horas después de la exposición de las larvas a las concentraciones de xantatos.

Las larvas tratadas con naranja de acridina proporcionaron una vista a los órganos afectados de las larvas de pez cebra, como fue mencionado por Tucker & Lardelli (2007). El colorante naranja de acridina es un buen indicador de apoptosis celular, causando que se note fluorescencia en la zona afectada frente al microscopio. Las células teñidas con naranja de acridina muestran signos de contracción celular, fragmentación celular y pérdida de los bordes celulares; eventualmente. Por otro lado, durante la necrosis, la fluorescencia anaranjada de los lisosomas desaparece debido al daño y pérdida del ADN celular, mientras que la señal de los núcleos lisos y contraídos permanece verde (Byvaltsev et al., 2019). En estos ensayos se observó que las zonas afectadas son principalmente las narinas, el corazón, yema e intestinos de los alevines, esto nos está hablando de una clara afectación de las larvas por ingestión del xantato al que se encuentran expuestas en el medio acuoso E2. En estos resultados se puede ver como a partir del control la fluorescencia en las concentraciones de 20 y 40 mg/L aumentan, las concentraciones de 60, 80 y 100 mg/L existe una disminución en la fluorescencia, posiblemente debido al inicio de un proceso de mortalidad de los individuos expuestos a las concentraciones más altas y por lo tanto más tóxicas (Fig. 6).

En estos ensayos, se tomaron en cuenta los parámetros usados por Brannen et al. (2010) para medir la teratogénesis. A diferencia de su estudio, se pudo comprobar que es necesario medir las longitudes de la cabeza, tórax y cola. Como se evidencia en los resultados, estas disminuyen en longitud mientras mayor es la cantidad de XT en el medio acuoso E2. Incluso se observa que tanto la cavidad pericárdica como los sacos de yema son grandes consecuencias de una falta de desarrollo normal. A medida que avanza el desarrollo embrionario, los sacos de yemas deben absorberse. Esta absorción se ve ralentizada en presencia del XT y los porcentajes de eclosión se reducen de forma pronunciada. Estos son claros indicios de teratogenicidad, por lo que se evaluó solo hasta las 72 horas de experimentación. Pasado este lapso, algunos embriones mueren por la exposición al tóxico. Esto indica que un mayor tiempo de exposición aumenta las consecuencias y la poca adaptabilidad de los embriones, por lo que alcanzan un desarrollo retardado hasta las 72 horas antes de morir.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alto, KJ, Broderius, S. y Smith, LL (1978). Toxicidad de los xantatos para peces e invertebrados de agua dulce. *Consejo de Calidad Ambiental de Minnesota*. Recuperado de :https://www.leg.mn.gov/docs/pre2003/other/cn004.pdf

Amrollahi, A., Massinaei, M., y Moghaddam, A. Z. (2019). Removal of the residual xanthate from flotation plant tailings using bentonite modified by magnetic nano-particles. *Minerals Engineering*, *134*,142-155. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.MINENG.2019.01.031

Amtmann, E., y Sauer, G. (1987). Selective killing of tumor cells by xanthates. *Cancer letters*, *35*(3), 237-244. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90125-X

Brannen, K. C., Panzica-Kelly, J. M., Danberry, T. L., y Augustine-Rauch, K. A. (2010). Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, *89*(1), 66-77.. Recuperado de: https://doi.org/10.1002/bdrb.20223

Busch, W., Duis, K., Fenske, M., Maack, G., Legler, J., Padilla, S., y Scholz, S. (2011). The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, September 2–3, 2010, Karlsruhe, Germany. *Reproductive Toxicology*, *31*(4), 585-588. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2011.02.010

Byvaltsev, V. A., Bardonova, L. A., Onaka, N. R., Polkin, R. A., Ochkal, S. V., Shepelev, V. V., y Potapov, A. A. (2019). Acridine orange: a review of novel applications for surgical cancer imaging and therapy. *Frontiers in oncology*, *9*, 925. Recuperado de: https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00925/BIBTEX

Castillo, G. (2004). Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas* (pp. 128–129).

Chaves, R. S., Guerreiro, C. S., Cardoso, V. V., Benoliel, M. J., y Santos, M. M. (2020). Toxicological assessment of seven unregulated drinking water Disinfection By-products (DBPs) using the zebrafish embryo bioassay. *Science of The Total Environment*, *742*, 140522. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140522

Donoghue, A. M. (1998). Carbon disulphide absorption during xanthate reagent mixing in a gold mine concentrator. *Occupational medicine*, *48*(7), 469-470. Recuperado de: https://doi.org/10.1093/OCCMED/48.7.469

Forbes, B. (2009). Papel del microscopio. E. M. Panamericana (Ed.). *Diagnostico Microbiologico*. (pp 88-89). Bogotá: Panamericana.

Fu, P., Wang, L., Ma, Y., y Hou, Z. (2020). A comparative study on the degradation of ethyl xanthate collector by O3, UV254nm, UV185+ 254nm, O3/UV254nm and O3/UV185+ 254nm processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *8*(1), 103628. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.JECE.2019.103628

Horzmann, K. A., y Freeman, J. L. (2018). Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences*, *163*(1), 5-12. Recuperado de: https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFY044

Kusuzaki, K., Hosogi, S., Ashihara, E., Matsubara, T., Satonaka, H., Nakamura, T., y Marunaka, Y. (2012). Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity. *Current pharmaceutical design*, *18*(10), 1414-1420. Recuperado de: https://doi.org/10.2174/138161212799504812

Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (Danio rerio): a review. *Aquaculture*, *269*(1-4), 1-20. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2007.04.077

Li, H., Yao, J., Duran, R., Liu, J., Min, N., Chen, Z., y Liu, B. (2021). Toxic response of the freshwater green algae Chlorella pyrenoidosa to combined effect of flotation reagent butyl xanthate and nickel. *Environmental Pollution*, *286*, 117285. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117285

Ping, S., Lin, W., Ming, R., He, Y., Yin, Y., & Ren, Y. (2022). Toxic effects of four cardiovascular drugs on the development and epigenetics of zebrafish (Danio rerio). *Science of the Total Environment*, 846, 157360. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.157360

Polaka, S., Koppisetti, H., Pande, S., Tekade, M., Sharma, M. C., y Tekade, R. K. (2022). Zebrafish models for toxicological screening. *Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations*, 221-240. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98367-9.00011-1

Prudence, B., Claver, M. P., Lambert, N., y Simon, B. (2022). Essentiality, Fate, Ecotoxicity, and Health Effects of Xanthates and Xanthates Based-Compounds—A Review. Journal of Geoscience and Environment Protection, 10(12), 161-203.

Qiao, Y. T., Lu, Y. X., Yu, P. F., Feng, N. X., Li, Y. W., Zhao, H. M., Y Li, Q. X. (2023). A novel method based on solid phase extraction and liquid chromatography-tandem

mass spectrometry warrants occurrence of trace xanthates in water. *Chemosphere*, *310*, 136770,310,136770.Recuperadode:https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.136770

Rezaei, R., Massinaei, M., y Moghaddam, A. Z. (2018). Removal of the residual xanthate from flotation plant tailings using modified bentonite. *Minerals Engineering*, *119*, 1-10. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.MINENG.2018.01.012

Sasseville, D., Muhn, C. Y., y Al-Sowaidi, M. (2003). Occupational allergic contact dermatitis from xanthates and carbamates in mining processes. *American Journal of Contact Dermatitis*, *14*(3), 166-168. Recuperado de: https://doi.org/10.2310/6620.2003.6192

Schick, H. D., Danhauser-Riedl, S., Amtmann, E., Busch, R., Reichert, A., Steinhauser, G., y Berdel, W. E. (1989). Antitumoral activity of a xanthate compound II. Therapeutic studies in murine leukemia and tumor models in vivo. *Cancer letters*, *46*(2), 149-152. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/0304-3835(89)90023-2

Tucker, B., y Lardelli, M. (2007). A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. *Zebrafish*, *4*(2), 113-116. Recuperado de: http://doi.org/10.1089/zeb.2007.0508

Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., y Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (Danio rerio) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*, *281*(1-3), 25-36. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004

Webb, M., Ruber, H., y Leduc, G. (1976). The toxicity of various mining flotation reagents to rainbow trout (Salmo gairdneri). *Water Research*, *10*(4), 303-306. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90171-8

8. FIGURAS

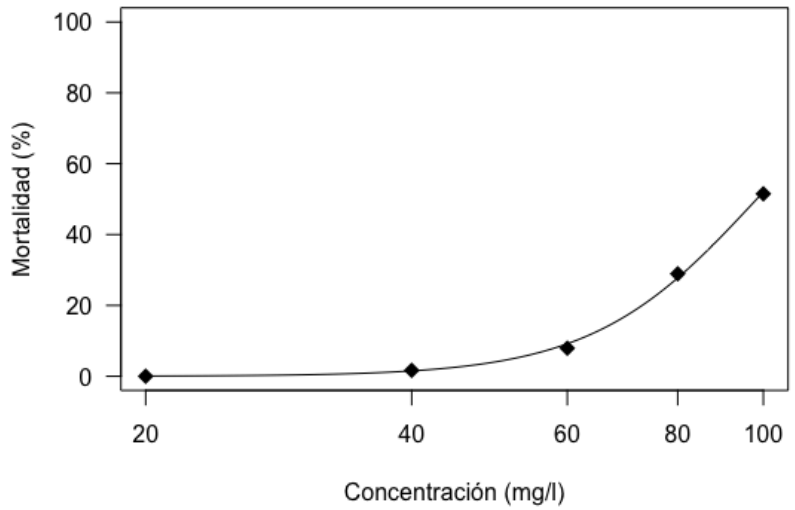


Figura 1. Porcentaje de mortalidad del xantato en cada una de las concentraciones las primeras 24 horas del tratamiento. Cada punto representa un grupo de alevines tratados en cada concentración (mg /L), el LC 50 en las primeras 24 horas es de 98,28 mg/L, con un margen de 83,399 y 103,45 mg/L.

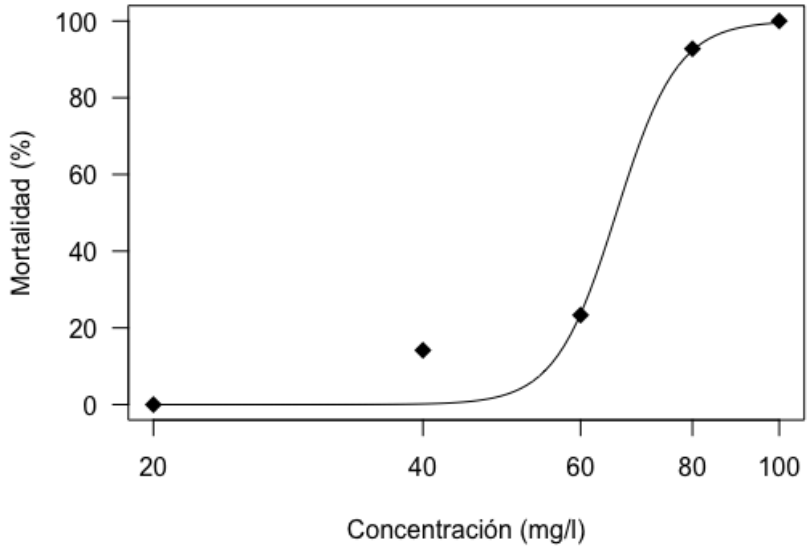


Figura 2. Porcentaje de mortalidad del xantato en cada una de las concentraciones a las 48 horas del tratamiento. Cada punto representa un grupo de alevines tratados en esa concentración (mg /L), el LC 50 es de 65,79 mg/L, con un margen de 61,3 y 70,28 mg/L.

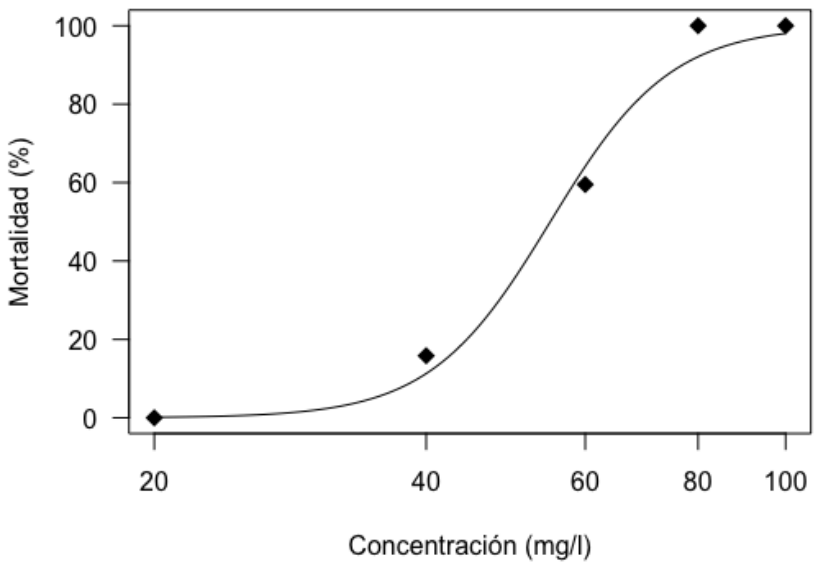


Figura 3. Porcentaje de mortalidad del xantato en cada una de las concentraciones a las 72 horas del tratamiento. Cada punto representa un grupo de alevines tratados en esa concentración (mg /L). El LC50 es de 54,88 mg/L, con un margen de 49,53 y 60,23 mg/L.

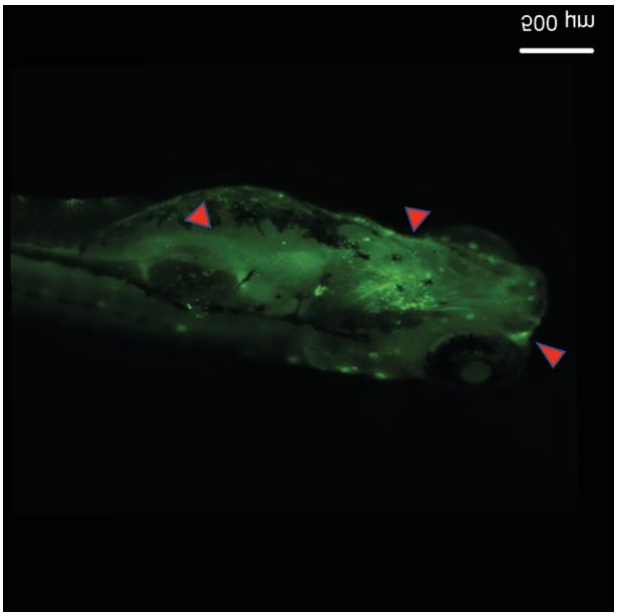


Figura 4. Tinción naranja de acridina, Fluorescencia en bulbos olfatorios, corazón, yema e intestinos de un embrión experimentado con xantato a una concentración de 20 mg/L. Las flechas rojas señalan las zonas afectadas por apoptosis marcadas con naranja de acridina.

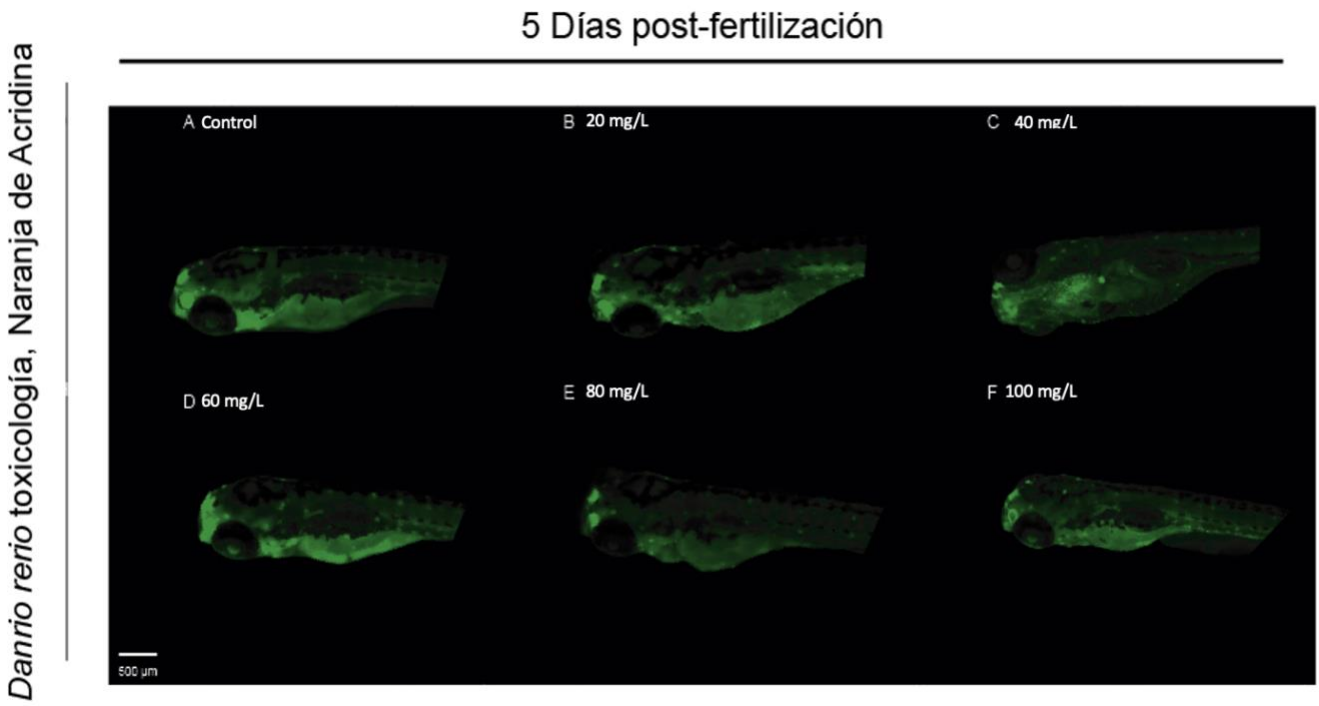


Figura 5. Tinción Naranja de acridina en ensayo toxicológico de alevines con 5 días post-fertilización. Cada letra representa una concentración diferente de exposición al xantato. A: grupo control, B:20 mg/L, C: 40 mg/L, D: 60 mg/L, E: 80 mg/L, F: 100 mg/L.

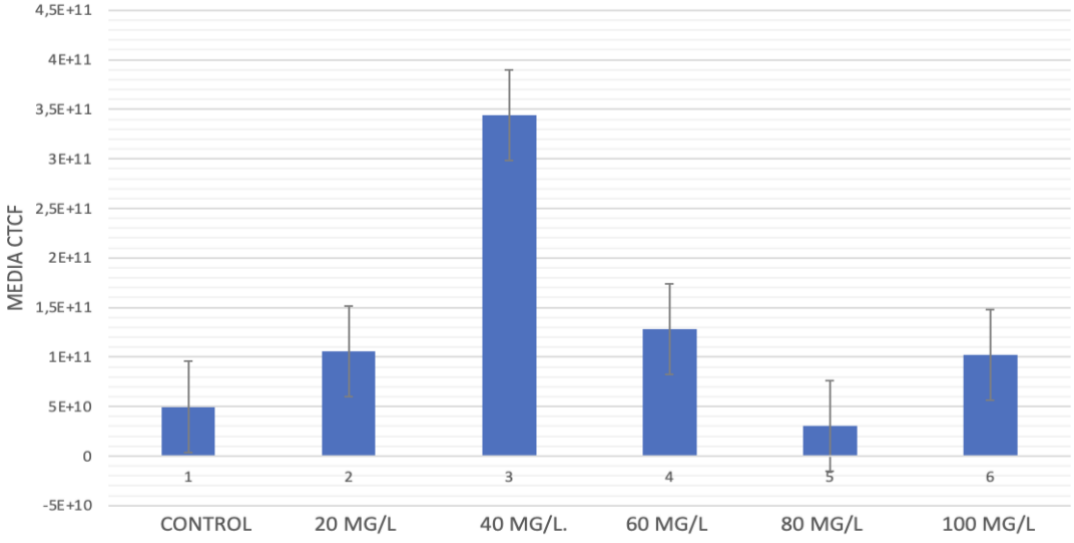


Figura 6. Medidas de CTCF (fluorescencia celular total corregida) promedios obtenidos de cada grupo de alevines por concentración. En "X" cada barra representa una concentración de menor a mayor (izquierda a derecha) siendo 1 el grupo control, 2: 20 mg/L, 3: 40 mg/L, 4: 60 mg/L, 5: 80 mg/L, 6: 100 mg/L. En "Y" los valores representan tamaños promedio por área (µm).

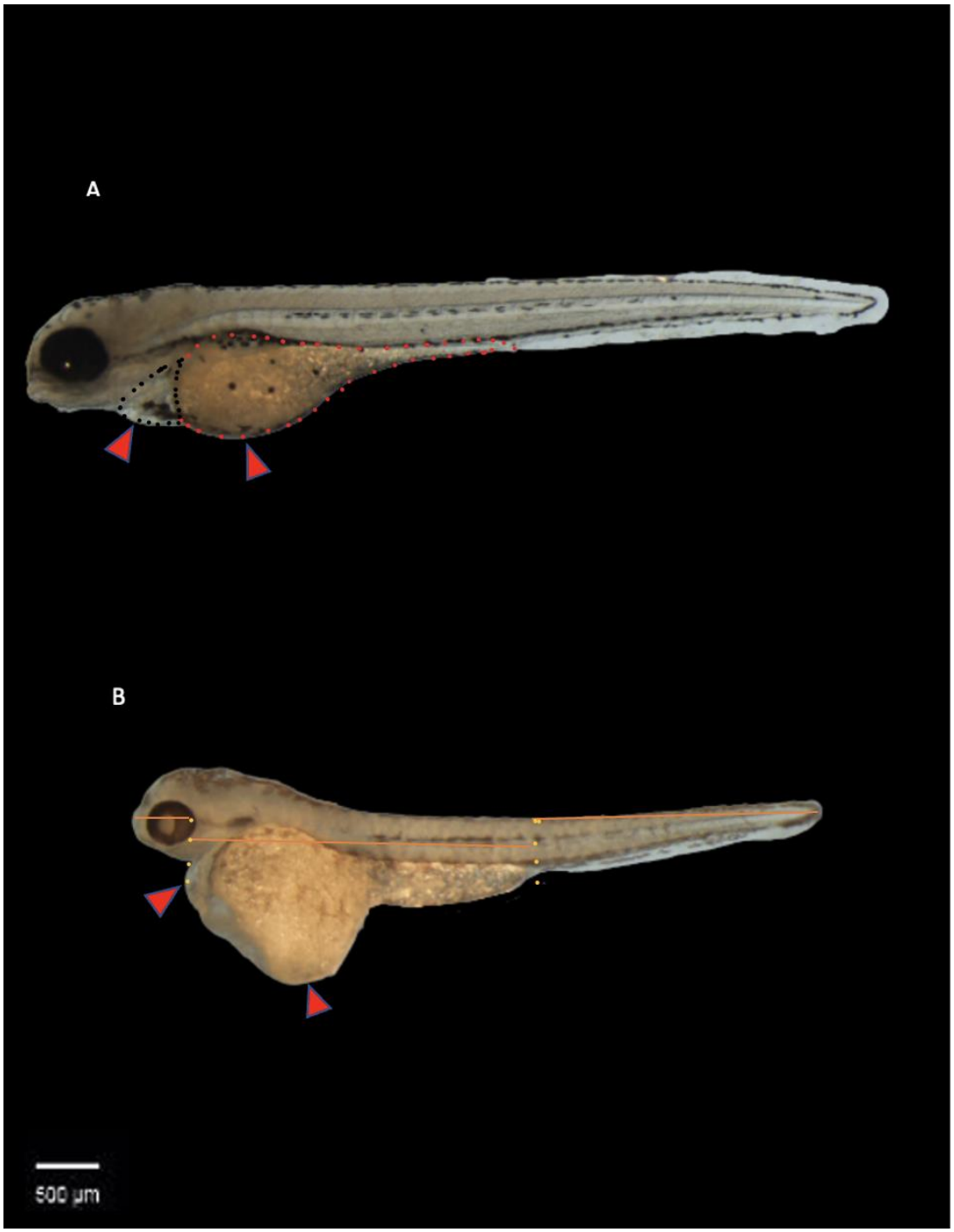


Figura 7. Comparación de un embrión de desarrollo normal (A), con un embrión expuesto a xantato amílico de potasio en 24 mg/L los puntos señalan como se midió el área de corazón y yema en cada embrión (B). Las líneas naranjas señalan las longitudes tomadas, los puntos señalan los limites considerados en cada medición. Las flechas rojas señalan el corazón y el saco de yema.



Figura 8. Comparación de embriones expuestos al xantato amílico de potasio. En cada concentración estando el grupo control en la parte superior y la concentración más alta en la inferior.

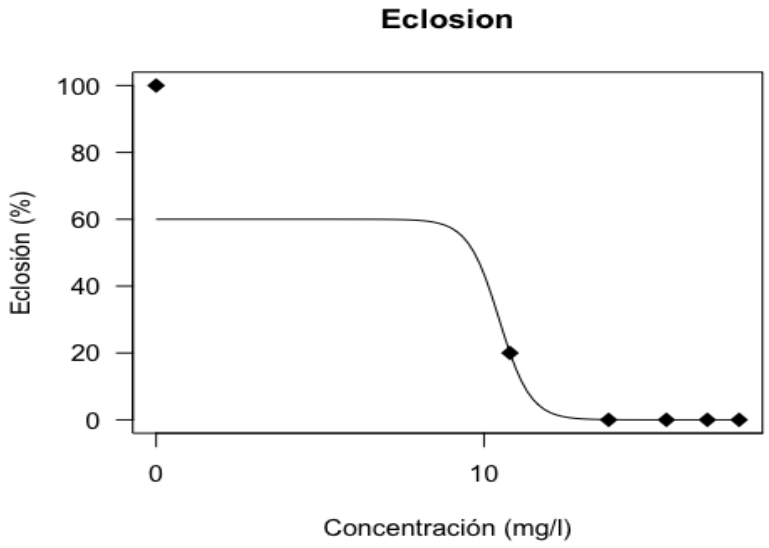


Figura 9. EC 50 del porcentaje de eclosionados en cada concentración de experimentación en teratogénesis. Cada punto representa un grupo de embriones tratados en esa concentración (mg /L).

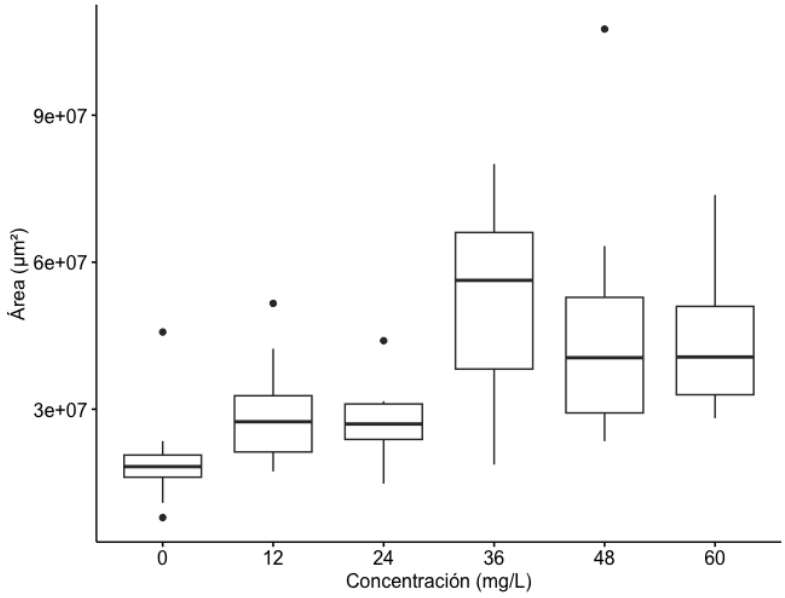


Figura 10. Comparación del tamaño del área pericárdica en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. El eje "X" representa las concentraciones de tratamiento en los que se realizaron las cuantificaciones. El eje "Y" los tamaños de edema pericárdicos.

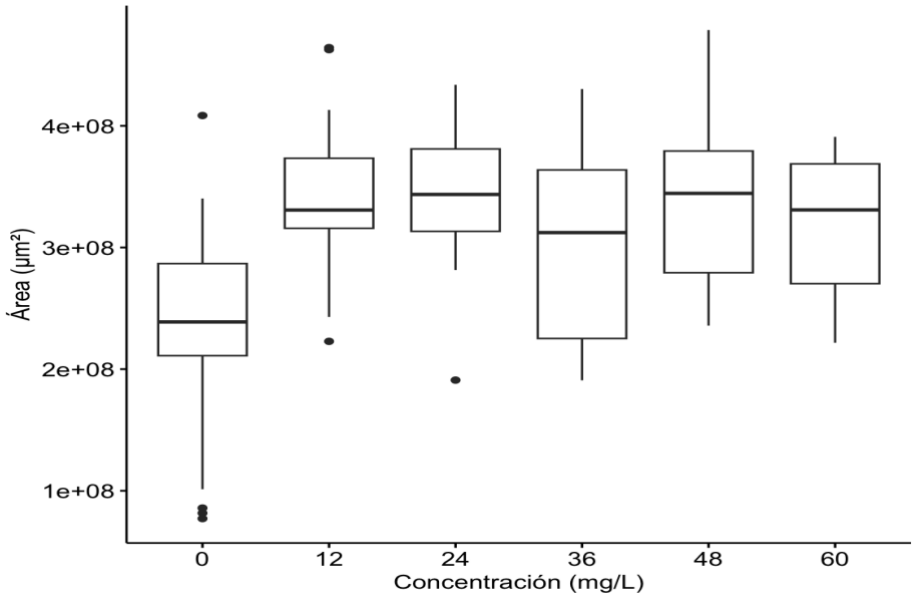


Figura 11. Comparación del tamaño de las yemas en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. El eje "X" representa las concentraciones de tratamiento en los que se realizaron las cuantificaciones. El eje "Y" los tamaños de área de yema.

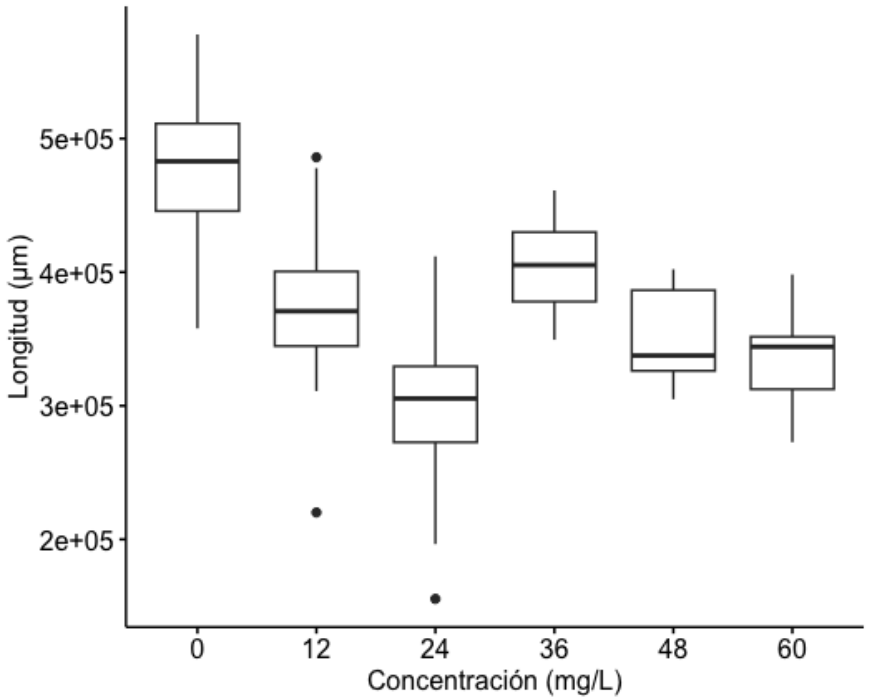


Figura 12. Comparación del tamaño de cabezas en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. El eje "X" representa las concentraciones de tratamiento en los que se realizaron las cuantificaciones. El eje "Y" las longitudes de tamaño de cabeza.

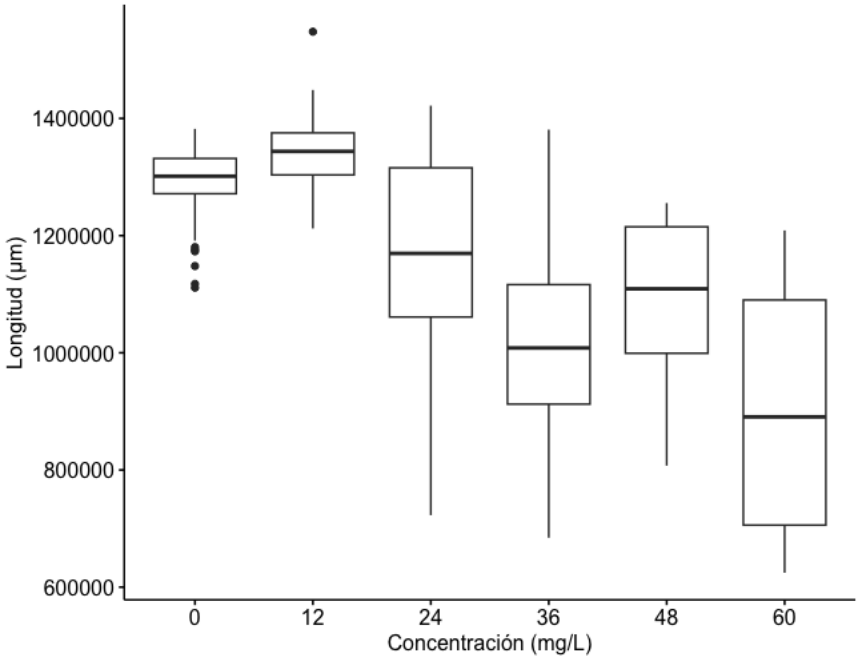


Figura 13. Comparación del tamaño del tórax en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. El eje "X" representa las concentraciones de tratamiento en los que se realizaron las cuantificaciones. El eje "Y" las longitudes de tamaño de tórax.

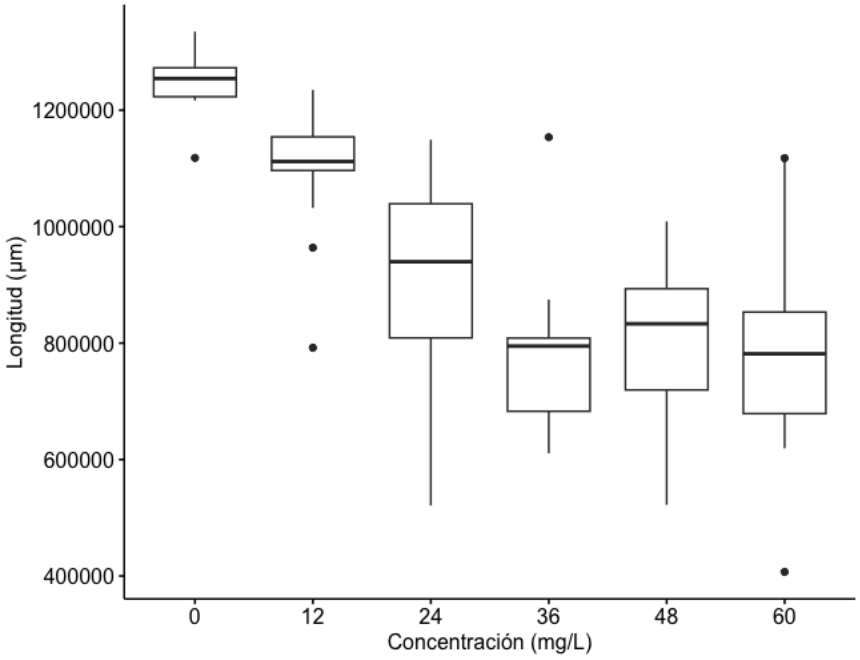


Figura 14. Comparación del tamaño de colas en embriones en cada una de las concentraciones de tratamiento. El eje "X" representa las concentraciones de tratamiento en los que se realizaron las cuantificaciones. El eje "Y" las longitudes de tamaño de colas.