

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**



**CAPACIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE COL LOMBARDA (*Brassica oleracea*
var. capitata) PARA NEUTRALIZAR LA TOXICIDAD DEL HIPOCLORITO DE
SODIO SOBRE *Daphnia magna* Straus**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

L.N. JACIVE PÉREZ JIMÉNEZ

REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE

TUTORES:

DR. AARÓN MENDIETA MOCTEZUMA

DR. HIPÓLITO MUÑOZ NAVA



IXTACUIXTLA, TLAX., JUNIO DE 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04

Publicación: Diciembre 2020

Revisión: 9001:2015 04

C.JACIVE PÉREZ JIMÉNEZ

P R E S E N T E

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de evaluación de examen de grado ha revisado el trabajo de investigación titulado: "CAPACIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE COL LOMBARDA (*Brassia oleracea* var. capitata) PARA NEUTRALIZAR LA TOXICIDAD DEL HIPOCLORITO DE SODIO SOBRE *Daphnia magna* Straus", realizado bajo la dirección de la Dra. Alba Mónica Montiel González y el Dr. Daniel Méndez Iturbide. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dra. Maribel Méndez Tepepa

Dr. Daniel Méndez Iturbide

Dr. Cuauhtémoc Morales Cruz

Dra. Alba Mónica Montiel González

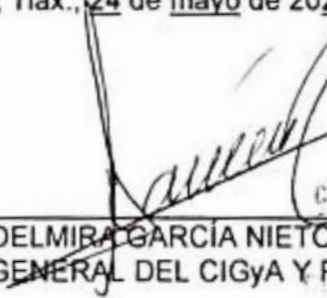
Dr. Aaron Mendieta Moctezuma

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"

Ixtacuixtla, Tlax., 24 de mayo de 2023.




CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS
EN SISTEMAS DEL AMBIENTE
DRA. EDELMIRA GARCÍA NIETO
COORDINADORA GENERAL DEL CIGyA Y POSGRADO

c.c.p. Expediente



Documento exclusivo para uso de la dependencia responsable o autoridad correspondiente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a el CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto (2020-2022).

Quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Alba Mónica Montiel González y el Dr. Daniel Méndez Iturbide, que me brindaron sus conocimientos invaluable para llevar a cabo esta investigación, y sobre todo su grande paciencia para esperar a que este trabajo pudiera llegar a su fin.

Agradezco a los miembros del jurado, la Dra. Maribel Méndez Tepepa, el Dr. Aaron Mendieta Moctezuma y el Dr. Cuauhtémoc Morales Cruz, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan.

Agradezco al Ing. Oliverio García Jiménez y a los excelentes profesores que hacen posible el conocimiento en las aulas del programa de maestría. Donde quiera que vaya, los llevaré conmigo en mi transitar profesional.

A mis padres, quienes sin estimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida, que me han formado y educado. A quienes la ilusión de su existencia ha sido verme convertida en persona de provecho. Hoy cuando concluyo mis estudios, les dedico a ustedes este logro amados padres, como una meta más conquistada. Gracias por permitirme llevar a cabo todos mis sueños e impulsarme para lograrlos.

Agradezco a mis hermanos quienes han estado conmigo llenándome de alegría, compartiendo nuestros sentimientos y proyectos viendo los grandes logros y tropiezos de una forma amena.

Quiero agradecer a mi esposo, por haberme brindado su apoyo y motivación durante el desarrollo de la maestría. Y finalmente a mi hijo Carlos Leonel, siendo el más grande tesoro de mi vida y además la fuente mas pura de mi inspiración, porque si no estuviera a mi lado este triunfo no seria lo mismo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Marco teórico.....	12
1.1.1. Contaminación del agua.....	12
1.1.1.2 Principales contaminantes que afectan a las comunidades y a los organismos	12
1.1.2. Hipoclorito de sodio.....	13
1.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas del NaClO	14
1.1.2.2. Propiedades químicas del NaClO	14
1.1.2.3. Producción, aplicaciones y usos del NaClO.....	16
1.1.2.4. Elaboración de soluciones antisépticas recomendadas para áreas de la salud.	17
1.1.2.5. Efecto del NaClO en especies acuáticas y humana.....	18
1.1.2.6. Cuantificación del hipoclorito de sodio de acuerdo con la NMX-K-SCFI-2012..	20
1.1.3.1. Propiedades físicas y químicas del Na ₂ S ₂ O ₃	20
1.1.3.2. Reacción de neutralización en soluciones de cloro con Na ₂ S ₂ O ₃	21
1.1.3.3. Potencial redox del NaClO y Na ₂ S ₂ O ₃	22
1.1.3.4. Ecotoxicidad del Na ₂ S ₂ O ₃	23
1.1.4. La química verde	23
1.1.5. <i>Brassicaceae</i>	24
1.1.5.1. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>	24
1.1.6. Antocianinas.....	27
1.1.6.2. Características químicas de las antocianinas	28
1.1.6.1. Actividad biológica de las antocianinas	29
1.1.6.3. Estabilidad de las antocianinas.....	30
1.1.6.4. Efecto del pH de las antocianinas	31
1.1.6.5. Método de extracción y purificación de antocianinas.....	32
1.1.6.6. Potencial redox de las antocianinas.....	33
1.1.7. Bioensayos para evaluar la calidad del agua	33
1.1.8. <i>Daphnia magna</i> Straus como organismo modelo ecotoxicológico.....	35
1.1.8.1. Relevancia de <i>Daphnia magna</i> en ecotoxicología.....	36
1.1.8.2. Métodos de prueba con <i>Daphnia magna</i>	37
1.1.9 Concentración letal media (CL ₅₀) y descripción del método “Probit”.....	37

1.3. Preguntas de investigación	41
1.4. Hipótesis.....	41
1.5. Justificación	42
1.6. Objetivos	43
1.6.1. Objetivo general.....	43
1.6.2. Objetivos específicos.....	43
II.METODOLOGÍA	44
III. RESULTADOS.....	50
IV. DISCUSIÓN	59
V. CONCLUSIONES	64
VI. PERSPECTIVAS	64
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
VIII. ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas del NaClO.	14
Tabla 2. Concentraciones recomendadas para desinfección con NaClO.	17
Tabla 3. Límites permisibles sanitarios de residuales de la desinfección.....	17
Tabla 4. Toxicidad por NaClO puro en especies acuáticas.	20
Tabla 5. OPR de iones tiosulfato.....	23
Tabla 6. Toxicidad por Na ₂ S ₂ O ₃ referido a la sustancia pura para especies acuáticas.....	23
Tabla 7. Descripción taxonómica de Brassica oleracea var. Capitata.	25
Tabla 8. Composición nutricional de Brassica oleracea var. Capitata por cada 100 g.....	26
Tabla 9. Sustituyente de las antocianinas.	29
Tabla 10. Material biológico para evaluar la calidad del agua.....	34
Tabla 11. Concentraciones de elución de soluciones por cromatografía en columna.	46
Tabla 12. Propiedades de las antocianinas comunes.....	46
Tabla 13. Resultados de la cromatografía en BAW y antocianina probable.	51
Tabla 14. Valores de mortalidad del bioindicador D. magna expuesto a K ₂ Cr ₂ O ₇	52
Tabla 15. Registro de mortalidad del bioindicador con NaClO (Cloralex 3.5 %).	53
Tabla 16. Valores de mortalidad del bioindicador D. magna expuesto a las antocianinas.....	54
Tabla 17. Valores de mortalidad del bioindicador D. magna con NaClO neutralizado con antocianinas.	55
Tabla 18. Cuantificación del ión cloro en solución con antocianinas.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formula química del hipoclorito de sodio (NaClO)..	13
Figura 2. Formula química del tiosulfato de sodio.....	21
Figura 3. Col lombarda (Brassica oleracea var. Capitata).	25
Figura 4. Molécula de antocianina.	28
Figura 5. Efecto de la temperatura sobre las antocianinas.	30
Figura 6. Escala de colores de la col lombarda como indicador de pH.	32
Figura 7. Morfología de <i>Daphnia magna</i>	35
Figura 8. Tonalidades del extracto de la B. oleracea..	50
Figura 9. Cromatopla de las fracciones F2 a F5.	51
Figura 10. Concentración y Probit empírico del control positivo ($K_2Cr_2O_7$).	52
Figura 11. Concentración y Probit empírico de NaClO.	53
Figura 12. Prueba de toxicidad de NaClO (Cloralex® 3.5%) y antocianinas sobre <i>D. magna</i>	54
Figura 13. Concentración y Probit empírico de antocianinas.	55
Figura 14. Prueba de toxicidad de soluciones de Cloralex + antocianinas sobre <i>D. magna</i>	56
Figura 15. Concentración y Probit empírico.	56
Figura 16. Concentración de NaClO en solución con antocianinas.	58

RESUMEN

La actual pandemia ha causado un importante incremento en la utilización de desinfectantes principalmente el hipoclorito de sodio (NaClO), por lo que se asegura un posible aumento en el riesgo ecotóxico por la presencia de este compuesto. Sin embargo, para la neutralización del NaClO se utiliza el tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) de carácter dañino para la vida acuática. Por lo que, actualmente las alternativas de usar productos naturales son muy importantes, como es el caso de compuestos orgánicos con acción antioxidante y alto poder reductor como las antocianinas procedentes de especies vegetales coloridas como la col morada. Este estudio tuvo como objetivo determinar el potencial redox de las antocianinas *B. oleracea* para la neutralización de la toxicidad del NaClO (Cloralex® 5.5%) en soluciones acuosas utilizando a *D. magna* como un modelo bioindicador. Se determinó que la principal antocianina presente en el extracto de *B. oleracea* es la cianidina (R_f 69.23 %). En una primera etapa se verificó la toxicidad de cinco concentraciones de NaClO (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L) sobre *D. magna* y se determinó la concentración letal media (24h- CL_{50}) en 0.11 mg/L. En la segunda etapa se determinó la no toxicidad de 5 concentraciones de antocianinas de *B. oleracea* (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L) sobre la viabilidad de *D. magna* al no observar efectos negativos. Posteriormente se determinaron, por yodometría, las concentraciones de antocianinas que disminuyeron la concentración de iones Cl^- de NaClO causante de la CL_{50} 0.11 mg/L, para establecer las condiciones de neutralización de la toxicidad sobre *D. magna* y se concluyó que las antocianinas de *B. oleracea* a todas las concentraciones probadas (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L) neutralizaron la toxicidad del NaClO a 0.11 mg/L, permitiendo la viabilidad del 100% del bioindicador. Finalmente, se determinó que la concentración mínima de antocianinas de *B. oleracea* que logró reducir en un 93% la concentración de iones Cl^- de las soluciones de NaClO de 0.11 mg/L, causante de la mortalidad del 50% de *D. magna*, fue de 0.02 mg/L, concluyendo que este compuesto tiene potencial para neutralizar la toxicidad del NaClO como un tratamiento alternativo más amigable con el ambiente.

ABSTRACT

The current pandemic has caused a significant increase in the use of disinfectants, mainly sodium hypochlorite (NaClO), thus ensuring a possible increase in the ecotoxic risk due to the presence of this compound. However, for the neutralization of NaClO sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) is used, which is harmful to aquatic life. Therefore, currently the alternatives to using natural products are very important, as is the case of organic compounds with antioxidant action and high reducing power, such as anthocyanins from colorful plant species such as purple cabbage. This study aimed to determine the redox potential of *B. oleracea* anthocyanins for the neutralization of NaClO (Cloralex® 5.5%) toxicity in aqueous solutions using *D. magna* as a bioindicator model. It was determined that the main anthocyanin present in the extract of *B. oleracea* is cyanidin (Rf 69.23%). In the first stage, the toxicity of five concentrations of NaClO (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 and 0.20 mg/L) on *D. magna* was verified, and the median lethal concentration (24h-LC₅₀) was determined at 0.11 mg/L. In the second stage, the non-toxicity of 5 concentrations of *B. oleracea* anthocyanins (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 and 0.20 mg/L) on the viability of *D. magna* was determined, as no negative effects were observed. Subsequently, the concentrations of anthocyanins that decreased the concentration of Cl⁻ ions of NaClO, causing the LC₅₀ 0.11 mg/L, were determined by iodometry to establish the conditions for neutralization of toxicity on *D. magna*, and it was concluded that the anthocyanins of *B. oleracea* at all concentrations tested (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 and 0.20 mg/L) neutralized the toxicity of NaClO at 0.11 mg/L, allowing 100% viability of the biomarker. Finally, it was determined that the minimum concentration of anthocyanins of *B. oleracea* that managed to reduce by 93% the concentration of Cl⁻ ions of NaClO solutions of 0.11 mg/L, causing 50% mortality of *D. magna* was 0.02 mg/L, concluding that this compound has the potential to neutralize the toxicity of NaClO as a more environmentally friendly alternative treatment.

I. INTRODUCCIÓN

En 1785, el químico Claude Louis Berthollet (1748-1822) descubrió la efectividad del hipoclorito de sodio (NaClO) como decolorante, con la finalidad de blanquear telas para una industria de tapicería (Po-chia *et al.*, 2007), llegando a ser considerado como uno de los desinfectantes más utilizados a finales del siglo XIX (Bermúdez, 2013). En la pandemia global de enfermedad respiratoria a consecuencia del coronavirus (COVID-19) se generalizó el uso frecuente de NaClO , al ser uno de los agentes recomendados por su efectividad en la destrucción del virus a una concentración de 0.1 % (OPS, 2020). Sin embargo, una vez ya utilizado dentro de los hogares, hospitales, industrias, etc., los residuos tienden a desecharse llegando como contaminante a los efluentes, muchos de ellos sin tratar, afectando principalmente a la biota acuática (peces y microorganismos), sin embargo, son algunas plantas (*Allum cepa* y *Lactuca sativa*) las que han sido utilizadas con la finalidad de evaluar su efecto tóxico.

La afectación causada por el NaClO se debe a que es un compuesto oxidante de rápida acción, incluido dentro de los diversos contaminantes detectados en efluentes residuales. El NaClO está compuesto por el ion hipoclorito (ClO^-), que al entrar en contacto con aguas residuales forma compuestos orgánicos oxidados (cloraminas, trihalometanos, cloratos, bromatos, etc.) resultado de una reacción redox.

La presencia de estos compuestos conlleva a un gran riesgo para el ambiente, debido a que son considerados tóxicos e incluso cancerígenos, causantes de la mortandad de animales acuáticos a concentraciones de 0.02 a 0.05 mg/L (NOM-052-SEMARNAT-2005; Causil *et al.*, 2017), lo que constituye un problema de salud pública. Algunos efectos detectados en peces expuestos a hipoclorito (ClO^-) son las dificultades respiratorias y en algunos casos la muerte (Shrivastava, 2015; Hemachandra y Pathiratne, 2016); mientras que, en plantas el efecto citotóxico del NaClO en raíces de *Allum cepa* genera anomalías celulares (cromosómicas), clasificándolo como una sustancia altamente citotóxica capaz de generar daños a concentraciones inferiores a 5 ppm (Pacheco 2017).

Para resolver esta problemática, en los tratamientos de agua potable se ha implementado la reacción de neutralización del NaClO a través del uso de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) reglamentando su uso con la norma oficial (NMX-K-281-SCFI-2012). Sin embargo, este compuesto también está catalogado como nocivo para el hombre y para la vida acuática (Divisa química, 2018), haciendo evidente la necesidad de buscar alternativas para su neutralización.

Actualmente el uso de productos naturales ha sido de gran importancia como alternativas para la sustitución de componentes sintéticos por ser no tóxicos, no alérgicos y ser biodegradables (Castro *et al.*, 2016).

En este sentido, estudios epidemiológicos describen las propiedades como pigmento y los efectos terapéuticos de los componentes bioactivos presentes en la col lombarda (*Brassica oleracea var. capitata*), tales como su potencial antioxidante, polifenoles, flavonoides y antocianinas (Charron *et al.*, 2015; Dyrby *et al.*, 2018).

En la naturaleza existen compuestos orgánicos con acción antioxidante y alto poder reductor como las antocianinas (provenientes de especies vegetales coloridas como la col morada, por mencionar alguna), que podrían constituir otra opción para el tratamiento de aguas residuales. Las antocianinas pertenecen a un grupo de antioxidantes que tienen la capacidad donante de hidrógeno o de electrones con potencial para prevenir o detoxificar procesos que generan radicales libres (Menzies *et al.*, 2016). Como parte del proceso de validación del potencial que algunos compuestos poseen para considerarse como alternativas dentro de algún tratamiento químico como la neutralización del NaClO, es necesario evaluar el éxito de la reacción sobre organismos bioindicadores. Entre los modelos biológicos más utilizados en ecotoxicología se encuentra el bioindicador acuático *D. magna*, debido a su corto ciclo de vida, la facilidad para establecer las pruebas en el laboratorio y a que es un representante adecuado del zooplancton (Dodson y Hazanato, 1995). La disminución de la toxicidad del NaClO a través de la neutralización asistida por compuestos naturales y evaluada sobre bioindicadores ha sido poco explorada. Por lo anterior, la presente investigación pretende determinar el potencial de las

antocianinas de *Brassica oleracea var. capitata f. rubra* para neutralizar la toxicidad del NaClO verificando a través de la mortalidad del bioindicador *D. magna*.

La implementación de los procesos alternativos de neutralización de contaminantes como el NaClO requiere del conocimiento profundo de las características químicas y funcionales de los compuestos que podrían tener dicho potencial. En este sentido, se abordará a continuación la información que da sustento a la presente investigación, desde la concepción de la contaminación del agua.

1.1. Marco teórico

1.1.1. Contaminación del agua

La contaminación del agua puede definirse como “la adición de todo elemento, compuesto, sustancia, derivado químico o biológico, energía, radiación o una combinación de ellos, cuya presencia en el agua, en diversas concentraciones o lapsos de tiempo, y como consecuencia, puede suscitar un peligro en la salud humana, en los ecosistemas y en la preservación de la riqueza ambiental” (Richardson *et al.*, 2016).

Las descargas de aguas residuales domésticas, industriales, agrícolas y pecuarias contienen elementos y sustancias químicas disueltas, así como sólidos suspendidos, en concentración variable, que si son vertidas sin tratamiento ocasionan la contaminación de los cuerpos de agua superficiales. Se estima que a nivel mundial entre 85 y 95% del agua residual se descarga directamente a los ríos, lagos y océanos sin recibir tratamiento previo (Conagua, 2015). En México, el 80 % de los ecosistemas acuáticos, entre ellos cuerpos de agua como los ríos, se encuentran bajo algún grado de contaminación, detectando contaminantes principalmente como materia orgánica, nutrientes (nitrógeno y fósforo) y microorganismos (coliformes fecales) (Hernández *et al.*, 2020).

1.1.1.2 Principales contaminantes que afectan a las comunidades y a los organismos

La clasificación de los contaminantes se lleva a cabo de acuerdo con el origen y el efecto que ocasionan en los diversos ecosistemas naturales (Rodier, 2015).

- Contaminación biológica: es originada por contaminantes que causan el incremento de la carga bacteriana o la presencia de microorganismos patógenos cuando existen grandes poblaciones de estos organismos pueden llegar a limitar el oxígeno del agua acabando con toda la vida acuática.
- Contaminación química: las sustancias químicas inorgánicas como los ácidos y los compuestos de metales tóxicos envenenan el agua, mientras que las sustancias químicas orgánicas como el petróleo, el plástico, los

plaguicidas, los detergentes, los desinfectantes tales como el NaClO y los productos farmacéuticos son potencialmente ecotóxicos.

Existe una gran cantidad de compuestos químicos contaminantes del agua entre los que se encuentra comúnmente el NaClO (Pathiratne *et al.*, 2015).

1.1.2. Hipoclorito de sodio (NaClO)

El NaClO es un compuesto químico (Figura 1) claro con ligero color verde-amarillento y olor característico al cloro, ampliamente utilizado por sus propiedades desinfectantes (Shrivastava, 2015; Baker *et al.*, 2003).

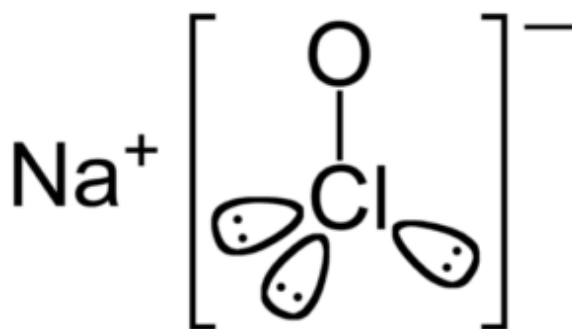


Figura 1. Formula química del hipoclorito de sodio (NaClO). Está conformado por un catión sodio (Na^+) y un anión de hipoclorito (OCl^- o ClO^-). (Baker *et al.*, 2003)

El NaClO fue sintetizado por el químico francés Claude Louis Berthollet en 1787 para blanquear telas. Posteriormente, a finales del siglo XIX Luis Pasteur demostró su acción desinfectante, incrementando su empleo en beneficio de la salud por eliminación de microorganismos patógenos. El NaClO es conocido como líquido blanqueador, soda blanqueadora, sal sódica del ácido hipocloroso, blanqueador y oxícloruro de sodio (Baker *et al.*, 2003). El NaClO pentahidratado muestra su punto fusión a los 27°C, de manera que se debe mantener a bajas temperaturas para que pueda conservar su estado sólido (Kirck & Othmer, 2000). Tomando en cuenta su inestabilidad, se encuentra usualmente en soluciones acuosas en concentraciones comerciales clasificadas en dos grupos: soluciones acuosas con concentración de cloro activo inferior al 10 % y superior al 10 % (Instituto del cloro, 2003).

1.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas del NaClO

El NaClO, contiene cloro en estado de oxidación +1 debido a esto se considera un oxidante fuerte y económico. Debido a esta característica destruye colorantes por lo que se le atribuye como un blanqueador y como un desinfectante. En la Tabla 1 se muestran las propiedades físicas del NaClO (Baker JT. 2003).

Tabla 1. Propiedades físicas del NaClO.

PROPIEDAD	VALOR
Peso Molecular (g/mol)	74,4
Estado Físico	Líquido
Punto de Ebullición (°C) (760 mmHg)	120 (Concentración cloro activo: 6.5%) 40 (5% de NaOCl en agua)
Punto de Fusión (°C)	8,6 (Concentración cloro activo: 6.5%) -6 (5% de NaOCl en agua)
Presión de Vapor (mmHg)	17,5 a 20°C (5% de NaOCl en agua)
Gravedad Específica (Agua = 1)	1,11 - 1,2 a 25°C, agua 4°C (Concentración cloro activo: 6.5%) 1,07 - 1,14 (5% de NaOCl en agua)
Densidad del Vapor (Aire = 1)	No Reportado
Velocidad de Evaporación (Acetato de Butilo = 1)	No Reportado
Solubilidad en Agua	Soluble en agua fría, se descompone en agua caliente (Concentración cloro activo: 6,5%) 100% en agua (5% de NaOCl en agua)
Límites de Inflamabilidad (% vol)	No combustible
Temperatura de Auto ignición (°C)	No reportado
Punto de Inflamación (°C)	No reportado
pH	12 (Concentración cloro activo: 6,5%) 9-10 (5% de NaOCl en agua)

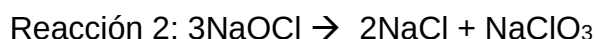
Fuente: (Baker JT. 2003).

1.1.2.2. Propiedades químicas del NaClO

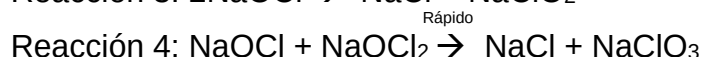
Los hipocloritos son considerados agentes oxidantes fuertes e incluso con mayor potencia que el peróxido de hidrógeno y el dióxido de cloro, por ello, el NaClO es un compuesto blanqueador y desinfectante usado para la destrucción de microorganismos. Las soluciones de NaClO se clasifican en blanqueadores de usos

doméstico con un porcentaje de cloro disponible que va del 5 al 5.5% y soluciones fuertes o comerciales con un porcentaje de cloro disponible del 12 al 15% (Baker *et al.*, 2003). El “contenido de cloro disponible” o “cloro activo” determina el potencial oxidante del compuesto con la cantidad de cloro elemental aplicado para preparar la solución.

El NaClO en solución se descompone de dos maneras: en la reacción 1, a cloruro de sodio (NaCl) y oxígeno (O₂). Mientras que, en la reacción 2, a cloruro de sodio y clorato de sodio (NaClO₃):



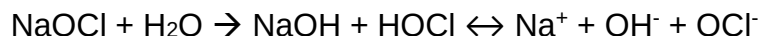
Estas dos reacciones se pueden dar en dos fases: en la reacción 3, se presenta la fase inicial lenta en el que se forma el clorito de sodio (NaClO₂), y en la reacción 4 se presenta la fase rápida por desproporcionamiento entre el hipoclorito y el clorito.



En la reacción 5, se muestra cómo el NaClO puede reaccionar con ácido hipocloroso (HOCl):



Las soluciones de NaClO se tienen que conservar a un pH 11, debido a que en medio ácido el hipoclorito se descompone más fácilmente que en medio básico, como se muestra en la ecuación de la solución de NaClO.



Estrella *et al.*, (2003), en su estudio acerca del mecanismo de acción del NaClO sobre microorganismos, determinó que este compuesto funciona como disolvente de materia orgánica a concentraciones de 2.5 a 5%, especialmente de ácidos grasos a los que convierte en sales de ácidos grasos (jabones) y glicerol (C₃H₈O₃).

Por otra parte, neutraliza a los aminoácidos generando agua y sales. En la formación de agua se reduce el pH con la reducción de iones hidroxilo (HO^-) estimulando así la presencia de ácido hipocloroso, que actúa como solvente al entrar en contacto con la materia orgánica; libera cloro que al combinarse con el grupo amino de las proteínas forma cloraminas, consideradas productos desinfectantes (Alarcon, 2019).

1.1.2.3. Producción, aplicaciones y usos del NaClO

El cloro en presencia de agua y de hidróxido de sodio produce hipoclorito de sodio pentahidratado ($\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). La solución de NaClO se elabora por medio de dos procesos: el proceso químico donde se preparan soluciones para ser almacenadas por un tiempo prolongado; y el proceso electroquímico *in situ* que se maneja en la preparación de soluciones para utilizarse después de un corto tiempo de la preparación (International Chemical Industries, 2003).

Los principales usos del NaClO son como desinfectante en labores de limpieza doméstica e industriales, en diversos procedimientos en el área de investigación y medicina que necesitan la desinfección de equipos y ambientes antisépticos, en el tratamiento de potabilización del agua, destrucción de algas y légamo en albercas, en procesadoras de alimentos, refinería de petróleo y aceites, en la producción de jabones, como blanqueador textil, etc. (Kirck y Othmer, 2000). La frecuencia de su empleo hace importante considerar una supervisión adecuada de su manipulación (Shrivastava, 2015).

Método químico

La reacción entre la solución de sosa cáustica y cloro líquido o gaseoso es el resultado de la elaboración de NaClO en solución, como se muestra a continuación:



Es necesario llevar a cabo procesos de refrigeración, teniendo en cuenta que esta reacción libera calor (Barrera *et al.*, 2016).

1.1.2.4. Elaboración de soluciones antisépticas recomendadas para áreas de la salud.

Se debe utilizar el NaClO a la concentración permitida en el país según sea la utilidad que se le dé como solución desinfectante (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones recomendadas para desinfección con NaClO.

Concentración de solución desinfectante para preparar 1 L de solución				
Use la concentración de Hipoclorito de sodio (disponible en el país) *	0.1%		0.5%	
	Para desinfección de superficies, pisos, utensilios de limpieza y mortuorios		Para derrames de fluidos corporales (sangre, vómitos, ...)	
	Hipoclorito de sodio	Cantidad de agua	Hipoclorito de sodio	Cantidad de agua
1%	100 mL	900 mL	500 mL	500 mL
3%	30 mL	970 mL	154 mL	846 mL
4%	25 mL	975 mL	125 mL	875 mL
5%	20 mL	980 mL	100 mL	900 mL
10%	10 mL	990 mL	50 mL	950 mL

Fuente: (OPS y OMS, 2020).

En el manejo de algún compuesto de cloro (dióxido de cloro, hipoclorito de sodio o de calcio y gas cloro) para la desinfección de agua, se deberá medir como cloro residual libre. A continuación, se muestran en la Tabla 3 los límites permitidos en el agua conforme a la NOM-127-SSA1-2017.

Tabla 3. Límites permisibles sanitarios de residuales de la desinfección.

Parámetros	Límite permisible	Unidades
Cloro residual libre	0.2 a 1.5	mg/L
Yodo residual libre	0.2 a 1.5	mg/L
Plata total	0.05 a 0.1	mg/L

Fuente: (NOM-127-SSA1-2017)

1.1.2.5. Efecto del NaClO en especies acuáticas y humana

La descarga de compuestos tóxicos en las aguas se vuelve una problemática en la salud pública; con respecto a los principales componentes de las aguas residuales se encuentran las soluciones de NaClO que generalmente son de uso habitual (Pathiratne, *et al.*, 2015). Se menciona que la cloración en el suministro de aguas residuales ocasiona efectos adversos, debido a que el cloro mezclado con amoníaco o aminas perjudica a la vida acuática por la formación de cloraminas. Este componente es un oxidante fuerte y puede ser letal para la mayoría de los peces a concentraciones de 0.02 a 5.9 mg/L (Iquiza, 2021); los síntomas que presentan por la sobreexposición es hiperactividad, movimientos espasmódicos de la cola, aletas o boca, saltar fuera del agua, les causa dificultades respiratorias y en algunos casos la muerte, incluso a concentraciones inferiores a 0.3 ppm (Shrivastava, 2015; Hemachandra y Pathiratne, 2016).

Durante el proceso de cloración se realiza la degradación del material fecal, por otro lado, se produce una serie de subproductos de la cloración (SPC) que llegan a ser tóxicos como resultado de la reacción entre el cloro y los compuestos orgánicos, la toxicidad indirecta por estos subproductos, provenientes del agua clorada, se ha vuelto una cuestión de inseguridad para su consumo, ya que son considerados cancerígenos, mutagénicos e incluso teratógenos para el ser humano y algunos otros organismos (Sánchez Zafra, 2008).

Riesgo ecotoxicológico del NaClO

Respecto al riesgo ecológico del NaClO en diferentes matrices ambientales se conoce lo siguiente:

- A. Aire: no hay suficiente información de las problemáticas ambientales en la atmósfera por los componentes de las soluciones de hipoclorito, pero se menciona que el NaClO con los rayos UV se descompone a NaCl y O₂ (Mexichem, 2010).
- B. Agua: en las aguas residuales hay presencia de materia orgánica que reaccionan al entrar en contacto con el cloro disponible que hay en las

soluciones de NaClO, de tal manera, que se producen compuestos orgánicos oxidados (trihalometanos, oxígeno, cloraminas, cloratos, etc.), las concentraciones que van de 0.02-0.05 mg/L pueden causar la mortalidad de especies como es el caso del fitoplancton marino (ATSDR, 2010).

- C. Agua de consumo: el agua para beber a concentraciones de cloro de 225 ppm presenta un sabor desagradable. El hipoclorito administrado al agua potable a concentraciones de 0.03-0.06 mg/L, con un pH de 7.0-8.5 a temperatura de 4-20°C mata a los microorganismos en un tiempo de 20 min. En las redes de suministro de agua potable se agrega cloro a concentraciones de 1.0-29.7 mg/L para conservar niveles de cloro residual de 0.2-6.0 mg/L con la seguridad de no perjudicar o causar daños a la salud humana (ATSDR, 2010).

Para el buen manejo del hipoclorito y para poder intervenir ante un accidente de derrame o la neutralización de acidez causados por este compuesto, es necesario basarnos en la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, Reglamento de la L.G.E.E.P.A en Materia de Residuos Peligrosos, las Normas Oficiales Mexicanas aplicables y a los ordenamientos técnicos-legales, tanto federales, estatales y municipales (Mexichem, 2010).

El NaClO a nivel comercial se encuentra a concentraciones que van de 0.5 a 5.25% ya que es considerado un producto tóxico y puede ocasionar daños tisulares cuando no es empleado adecuadamente (Juárez y Lucas, 2001). Es una sustancia altamente citotóxica a concentraciones inferiores a 5 ppm (Causil *et al.*, 2017). En la especie *Allium cepa* el NaClO genera anomalías celulares (cromosómicas) e inhibe la división celular. Por considerarse una sustancia inorgánica no es posible aplicarle un método para determinar la biodegradabilidad. A pesar de ser diluido en agua el NaClO forma soluciones cáusticas, de manera, que es utilizado en los tratamientos de aguas residuales para la reducción de microorganismos patógenos. Así mismo, estas sustancias traen consecuencias de mortalidad a la biota acuática por diversificación de pH. En la Tabla 4, se mencionan algunos organismos que son

afectados por este compuesto con la CL₅₀ que les causa mortalidad en diferentes lapsos de tiempo.

Tabla 4. Toxicidad por NaClO puro en especies acuáticas.

ORGANISMO	CL ₅₀ Y TIEMPO
<i>ONCHORHYNCHUS MYKISS</i>	0.07 mg/L /48 h
<i>P. PROMELAS</i>	1.34 mg/L /96 h
<i>L. MACROCHIRUS</i>	1.1 mg/L /96 h
<i>DAPHNIA MAGNA</i>	0.07 – 0.7 mg/L /24 h

Fuente: (Baker JT. 2003).

1.1.2.6. Cuantificación del NaClO de acuerdo con la NMX-K-SCFI-2012

El objetivo principal de la norma es cuantificar la concentración de NaClO en solución. Se agrega yoduro de potasio la solución de hipoclorito en un medio ácido. Al reaccionar, el yodo libre se titula con una solución de tiosulfato (NMX-K-281-SCFI-2012).

1.1.3.1. Propiedades físicas y químicas del Na₂S₂O₃

El tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) es considerado una sal orgánica elemental, debido a las utilidades médicas que se le dan, así también, es fundamental para neutralizar sistemas de aguas cloradas.

Este compuesto inorgánico tiene una estructura cristalina de tipo monoclinica, lo integran dos cationes sódicos (Na⁺) y el anión tiosulfato con carga negativa (S₂O₃⁻), el átomo de azufre central está unificado con tres átomos de oxígeno y otro átomo de azufre mediante enlaces simples y dobles con carácter de resonancia (National Center for Biotechnology Information., 2017; Figura 2).

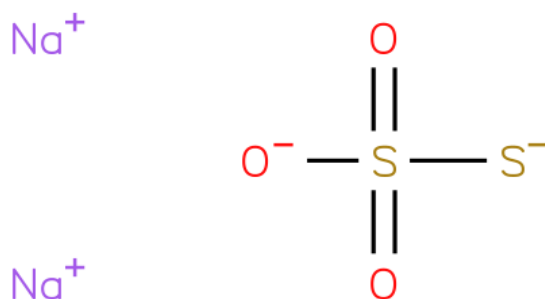


Figura 2. Formula química del tiosulfato de sodio (National Center for Biotechnology Information, 2017).

El $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en su manera anhidra tiene un peso molecular de 158.11 g/mol y en su forma pentahidratada de 248.18 g/mol, con una densidad de 1.667 g/mL (National Center for Biotechnology Information, 2017). Es una sal neutra, no posee un olor característico, es incolora y se caracteriza por sus cristales monoclinicos; es eflorescente, es decir, que al estar en contacto con el aire hay una pérdida de agua de cristalización y se disminuye en forma de polvo. Este compuesto es insoluble en metanol, sin embargo, en agua es muy soluble para su forma pentahidratada. Su punto de fusión es a los 48°C y a los 100°C se empieza a deteriorar (Royal Society of Chemistry, 2015).

El $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ se disocia fácilmente en agua para dar iones sodio y tiosulfato. En ambientes normales es un sólido neutro, pero a altas temperaturas es inestable y da como resultado sulfato y polisulfuro sódicos:

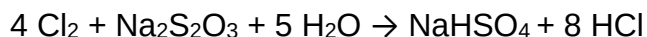


1.1.3.2. Reacción de neutralización en soluciones de cloro con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

La norma "Standard Methods for the examination of water & wastewater, 9060 A, sample collection, dechlorination" establece las siguientes proporciones (Norma de referencia mundial en métodos de análisis de aguas, 2013):

Las reacciones involucradas son:

- a) Neutralización por reacción redox del cloro libre:



De acuerdo con esta reacción 4 moles (275.6 g) de cloro son neutralizados (estequiométricamente) por 1 mol (158.11 g) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

b) Neutralización por reacción redox del hipoclorito presente, como ácido hipocloroso o como hipoclorito de sodio y/o calcio:



1.1.3.3. Potencial redox del NaClO y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

El ácido hipocloroso (HOCl) y el ion hipoclorito (OCl^-), son considerados agentes oxidantes fuertes. Reaccionan con una diversidad de moléculas biológicas como las proteínas (Hawkins y Davies, 1998 y 1999; Hazell *et al.*, 1993 y 1994), los aminoácidos (Nightingale *et al.*, 2000), los péptidos (Heinecke *et al.*, 1993), los lípidos (Spickett *et al.*, 2000) y el ADN (Prutz, 1998) en condiciones fisiológicas de pH.

A continuación, se presentan los potenciales de electrodo estándar para la reducción de HOCl y OCl^- (Fukuzaki, S. 2006):



El $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a una concentración de 2.2 g/L con un pH de 1.8 y 2.2, por medio de un estudio de oxidación y potenciales de óxido-reducción (OPR), muestra una propiedad redox de 615 mV (Arce *et al.*, 2015).

Los potenciales de oxido-reducción de los iones tiosulfato varían debido a los oxo-aniones del azufre, como se muestra en la Tabla 5 (Bernard, 1995):

Tabla 5. OPR de iones tiosulfato.

iones tiosulfato	OPR
$\text{H}_2\text{SO}_3 / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$E^\circ = 0,40 \text{ V}$
$\text{SO}_3^{2-} / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$E^\circ = 0,571 \text{ V}$
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} / \text{S}$	$E^\circ = 0,5 \text{ V}$
$\text{S}_4\text{O}_6^{2-} / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$E^\circ = 0,08 \text{ V}$

1.1.3.4. Ecotoxicidad del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

El $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ es catalogado como un compuesto tóxico para algunas especies acuáticas. Sin embargo, las propiedades toxicológicas de este material no han sido plenamente investigados. En las hojas de seguridad de la sustancia química bajo la normativa legal NOM-018-ST-2000 mencionan la CL_{50} y el tiempo que les causa la mortalidad a algunos organismos como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Toxicidad por $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ referido a la sustancia pura para especies acuáticas.

Organismo	CL_{50} y tiempo
<i>Pimephales. promelas</i>	>10,000 mg/L/96h
<i>Gambusia affinis</i>	26,000 mg/L/48h
<i>Daphnia magna</i>	CE_{50} : 1,223 mg/L/48h

Fuente: Divisa química (2018).

1.1.4. La química verde

La química verde pertenece a una rama de la química cuyo principal objetivo es reducir y eludir la contaminación mediante el desarrollo de procesos que disminuyan la utilización y producción de compuestos dañinos o tóxicos para el ambiente, (EPA, 2017).

Al elaborar un producto verde se debe considerar que sea viable, es decir, que no se presente un potencial dañino a nivel ambiental por su uso. Además, en cuestiones sociales y económicas son un producto sostenible (González Dávila, 2016). Entre las opciones de compuestos que cuentan con el potencial de neutralizar oxidantes fuertes como el NaClO están los antioxidantes naturales (Muedas *et al.*, 2008). En la naturaleza existen diversos compuestos con estas

características y se denotan por su colorido, como es el caso de algunas especies de plantas del género *Brassicaceae*.

1.1.5. *Brassicaceae*

Brasicáceas (Brassicaceae) o crucíferas (*Cruciferae*), pertenecen a una familia de plantas constituida por 338 géneros y 3710 especies. Esta gran diversidad hace una familia interesante por la diversa utilidad para el humano; algunas de sus especies son empleadas como alimento natural o procesado, como plantas medicinales, decorativas y alimento para la ganadería. Entre las variedades cultivadas se encuentran el repollo, la coliflor, las coles de bruselas, el brócoli, el brécol, la lombarda (*Brassica oleraceae*), el berro (*Nasturtium officinale*), el rábano (*Raphanus sativus*) y el nabo (*Brassica rapa*). Una variedad cultivada con fines decorativos es el alhelí (*Erysimum cheiri*) y algunos géneros son considerados maleza en regiones de cultivo con provecho para la alimentación animal. Su producción se da especialmente en regiones templadas en los hemisferios norte y sur, en la región Mediterránea y Asia Central. Sin embargo, la distribución de cultivo se ha esparcido a regiones tropicales y subtropicales y se producen durante todo el año (Rojas *et al.*, 2004).

1.1.5.1. *Brassica oleracea* var. *Capitata*

Brassica oleracea es una hortaliza comestible de fuerte y característico sabor, es conocida comúnmente como col lombarda, col morada y col roja por su distinguido color morado. El término común de la col proviene del francés *caboche* que significa “cabeza” (WCSP, 2018). Se considera una de las más antiguas debido a que ha sido cultivada por los últimos 2000 años (Monreu, 2015). Al Oeste y costas de Francia, fue descubierta de manera silvestre, para después ser distribuida por todo el mundo (Fornaris, 2014).



Figura 3. Col lombarda (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) (Fornaris, 2014).

Taxonomía de *Brassica oleracea* var. *Capitata*

La col lombarda presenta las siguientes características taxonómicas (tabla 7):

Tabla 7. Descripción taxonómica de *Brassica oleracea* var. *Capitata*.

Taxonomía	Nomenclatura
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Brassicales</i>
Familia	<i>Brassicaceae</i>
Género	<i>Brassica</i>
Especie	<i>Brassica oleracea</i>

Fuente: (Davise *et al.*, 2015).

La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural señala que, en el año 2018, la producción de *B. oleracea* superó las 214 mil toneladas, fue cultivada en 24 estados donde Puebla, Nuevo León y Chiapas se colocaron como los principales productores de esta hortaliza (SADER, 2019).

Esta hortaliza ha sido evaluada por sus propiedades nutricionales como fuente rica en fibra, vitaminas, minerales, y con un gran número de sustancias bioactivas entre las que destacan los glucosinolatos (isotiocinato, sulforafano, Indol-3-carbinol). Por

sus altas concentraciones de antioxidantes y su utilidad como colorante natural, es considerada una de las especies de *Brassica* más apreciada y significativa, por su composición nutricional (Tabla 8). Además, es de fácil almacenamiento por su tiempo de vida media de 2 a 3 meses, lo que le permite estar fresca y conservada (Valencia-Arredondo, 2015; Wiczowski *et al.*, 2015).

Tabla 8. Composición nutricional de *Brassica oleracea* var. *Capitata* por cada 100 g.

Nutriente	Cantidad
Energía (cal)	30
Proteína (g)	1.70
Grasa total (mg)	0.10
Colesterol (mg)	-
Glúcidos	7
Fibra (g)	1.50
Calcio (mg)	32
Hierro (mg)	0.70
Yodo (µg)	-
Vitamina A (mg)	10
Vitamina C (mg)	71
Vitamina D (mg)	-
Vitamina E (mg)	0
Vitamina B12 (mg)	-
Folato (µg)	0

Fuente: (Fundación universitaria Iberoamericana, 2017).

Característica fitológica

La producción de la hortaliza se da dos veces al año, tiene una raíz pivotante (raíz principal, persistente y más gruesa), el tallo presenta una altura aproximada de 60 cm; es pequeño, semileñoso y rígido, no tiene ramificaciones. Sus hojas son amplias, en forma de ovalo, pecioladas con nervaduras de manera que le dan un aspecto de cabeza o capullo. Las flores tienen pétalos amarillos y pedúnculos (tejido que sostiene a una flor). El fruto es coniforme, cuenta con cerca de 13 semillas de

color gris o café, y tiene una consistencia firme y dura lo que constituye su parte comestible (Hurrell *et al.*, 2009). Su cultivo se puede adaptar a los diferentes tipos de suelo, principalmente, a aquellos que contengan desechos vegetales o animales de cualquier tipo, que sean de climas templados; su temperatura óptima va de 15 a 20°C, mientras que resiste de 0 °C a 27 °C, su pH oscila de los 6.5 a 7.5 (Benavides *et al.*, 2010).

B. oleracea var. *Capitata* contiene una compleja mezcla de fitoquímicos que le atribuyen propiedades antioxidantes, el grupo más diverso de polifenoles en esta especie son los flavonoides, principalmente las antocianinas que le dan ese característico color púrpura y que tienen un importante papel en la salud humana (Valencia- Arredondo, 2015).

1.1.6. Antocianinas

El término de antocianinas deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro). Estos compuestos constituyen un conjunto de pigmentos hidrosolubles naturales que se encuentran en frutas, verduras y plantas; en estas últimas son las encargadas de las tonalidades de azul, púrpura y naranja debido a las diferentes condiciones de pH. Las antocianinas son de gran importancia en las flores, en su ecofisiología y en su propagación; influyen en la atracción de polinizadores y componentes de protección en las plantas ante los elementos de estrés bióticos y ambientales (Menzies *et al.*, 2016).

Las antocianinas pertenecen a los flavonoides glucosídicos de las antocianidinas que se encuentran en la célula vegetal principalmente en las vacuolas. Estos pigmentos tienen la capacidad de ser el sustituto de los pigmentos artificiales en la producción de artículos de valor agregado para uso humano como los medicamentos, los cosméticos y los alimentos (Gullón *et al.*, 2020). Constituyen al conjunto de colorantes más grandes descubiertos en el reino vegetal, así como también, el más trascendental antes de la clorofila. Las propiedades de las antocianinas son: 1) protección de los cloroplastos por exposición extensa a la luz,

2) reducción de la radiación UV-B y 3) actividad antioxidante, como respuesta al estrés provocados por temperaturas extremas, radiación UV, deficiencia de nutrientes, sequías, exceso de luz e infecciones bacterianas o por hongos en las plantas (Gould *et al.*, 2009).

Durante el proceso de la fotosíntesis es indispensable la luz, por el contrario, un exceso de ésta origina la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como $O_2 \cdot$, H_2O_2 y $OH\cdot$ causando reacciones indeseables como el estrés oxidativo, que daña las membranas, degrada los cloroplastos y provoca inestabilidad en las defensas de la planta a las ROS, mientras que las antocianinas aminoran el daño a los cloroplastos (Zhang *et al.*, 2010).

1.1.6.2. Características químicas de las antocianinas

Las antocianinas están caracterizadas por complejos patrones de hidroxilación, metoxilación, glicosilación y acilación en diversas plantas. Cuando en una misma molécula se perciben dos glúcidos, generalmente se encuentran aciladas con hidroxibenzoicos, ácidos cinámicos y ácidos alifáticos. La acilación hace más estable el pigmento, pero no presenta coloración (Gürses *et al.*, 2016).

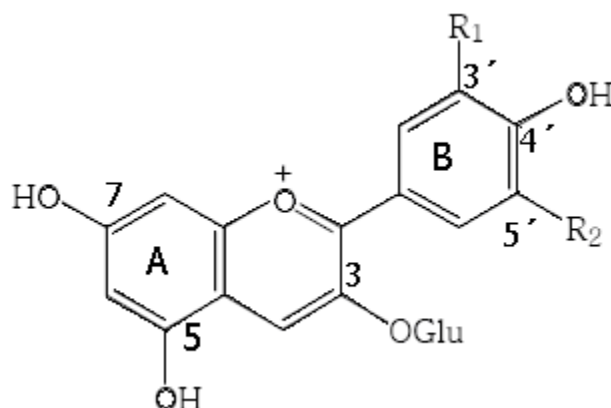


Figura 4. Molécula de antocianina. Su estructura básica es un núcleo flavón el cual consta de dos anillos aromáticos A y B unida por una cadena de tres carbonos (Fuente: Ignacio *et al.*, 2011).

Las antocianinas por su naturaleza química corresponden al grupo de los flavonoides como glucósidos, designados antocianidinas de las cuales se estima la existencia de más de 600, sin embargo, solamente 6 antocianidas son las más habituales, entre las que se encuentran la petunidina (Pt), la malvidina (Mv), la pelargonidina (Pg), la delfinidina (Dp), la cianidina (Cy) y la peonidina (Pn), como se muestra en la Tabla 9 (Wu, 2006). Estructuralmente están conformadas por 2 anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena de 3 carbonos y un anillo heterocíclico (C) (Ignacio *et al.*, 2011), que se llegan a diferenciar por dos sustituyentes (R_1 y R_2) en donde se unen los azúcares (arabinosa, galactosa, glucosa, ramnosa, rutinosa y xilosa) (Kamiloglu *et al.*, 2015).

Tabla 9. Sustituyente de las antocianinas.

Aglicona	Abrev.	Sustitución		Color visible
		R_1	R_2	
Cianidina	Cy	OH	H	naranja – rojo
Dlfinidina	Dp	OH	OH	azul – rojo
Malvidina	Mv	OMe	OMe	azul – rojo
Peonidina	Pn	OMe	H	naranja – rojo
Pelargonidina	Pg	H	H	Naranja
Petunidina	Pt	Me	OMe	azul – rojo

Fuente: (Wu, 2006).

La antocianidina está compuesta por el ion flavilio, que debido a la baja cantidad de electrones que posee, se comporta sensible a los cambios de pH de las sustancias a las que se expone. El pigmento de las antocianinas depende de la disposición y número de los grupos hidroxilos y metoxilo en su molécula, si se presenta un incremento de metoxilación se originan tonalidades rojas, por el contrario, si hay un incremento de hidroxilación se originan tonos azules (Garzón, 2008).

1.1.6.1. Actividad biológica de las antocianinas

Las antocianinas reducen enfermedades coronarias en humanos, hecho probado en estudios realizados con antocianinas del vino, debido a que atrapan ROS e inhiben la oxidación de lipoproteínas, concluyendo así, que en Francia el riesgo de

padecer enfermedades coronarias es bajo debido al excesivo consumo de vino tinto (Aguilera *et al.*, 2011).

Hagiwara *et al.*, 2003, describen que una ingesta de col y papa morada en la alimentación de ratas ocasiona la supresión de tumores, por lo tanto, se le considera con funciones antitumorales y anticancerígenas.

Actualmente, existen extractos de antocianinas integrados como suplementos alimenticios en el mercado, como es el caso de los extractos de maíz morado; otros colorantes naturales extraídos de flores, frutas y verduras encuentran un uso farmacéutico, cosmético, alimentario e incluso para tinción textil. El empleo de estas fuentes colorantes está contribuyendo a aminorar el daño ambiental y el daño hacia la salud humana (Shipp & Abdel, 2010; Aguilera *et al.*, 2011).

1.1.6.3. Estabilidad de las antocianinas

Agentes externos como la temperatura perjudican la estabilidad de los pigmentos de antocianinas. A los 4°C se muestran estables, pero con el aumento de temperatura se origina una carencia de la azúcar glicosilada en la posición C-3 de la molécula, causando una abertura del anillo y produciendo chalconas descoloridas inestables (Figura 5). Por último, la pérdida de antocianinas es causada por el efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico. Por otra parte, el oxígeno al ser excluido no produce cambios en el pigmento (Alamilla *et al.*, 2016).

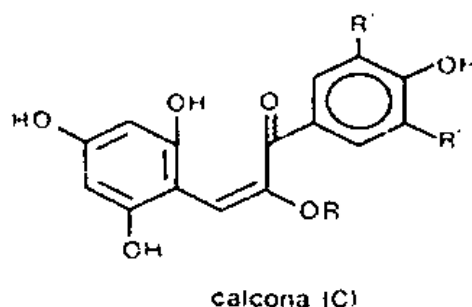


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre las antocianinas (Fuente: Garzón, 2008).

1.1.6.4. Efecto del pH de las antocianinas

El ion flavilio de las antocianinas muestra sensibilidad a cambios de pH por su bajo contenido de electrones, lo que a su vez lo hace muy reactivo. En el caso de las frutas el cambio de pH se percibe cuando éstas maduran, el efecto de la diferenciación en el pH se da directamente en el cambio de color; químicamente esto se debe a las variaciones en la estructura de las antocianinas (Budui Delgar, 2006). Estos pigmentos funcionan como un indicador de pH debido a la disminución de las cargas positivas del núcleo flavilio que están presentes en las moléculas de las antocianidinas. Al presentarse un pH básico modifica la distribución electrónica llegando a una forma quinoidal donde se observa una tonalidad azul (Ocampo *et al.*, 2008).

Los efectos de las sustancias sobre la estabilidad y estructura de las antocianinas dependerán del pH; un medio ácido le dará la acción protectora. Para obtener el pigmento de manera más estable o el catión flavilio (AH^+) de un pigmento rojizo intenso, los valores de pH deberán estar por arriba de dos en soluciones acuosas. A valores de pH inferiores, el hemiacetal y la chalcona se forman de maneras inestables e incoloras. A valores de pH superiores a 7 se muestran quinoidales (A^-) de una tonalidad púrpura, que al estar en contacto con el aire se degradan rápidamente (Hutchings, 1999).

***B. oleracea* como indicador de pH**

El extracto de antocianinas de *B. oleracea* es ligeramente ácido por lo que ha permitido trabajarlo como un indicador de pH de forma natural. Los ensayos con este indicador natural están hechos con sustancias básicas y ácidas como el ácido acético ($C_2H_4O_2$), comúnmente conocido como vinagre, se demostró tener un pH de 2.6 y al ser combinado con el indicador natural toma un color rojizo. La escala de pH para *B. oleracea*, se puede observar en la Figura 6, fue diseñada a partir de ensayos realizados con un potenciómetro, evidenciando su potencial como indicador al presentar una amplia escala de pH.

COL LOMBARDA	
pH	Color
< 2	Red
4	Orange
6	Pink
7	Purple
7.5	Blue-gray
9	Light blue
10	Cyan
12	Green
> 13	Yellow

Figura 6. Escala de colores de la col lombarda como indicador de pH (Ballesteros Fortich y Diaz Barroso, 2017)

Estas propiedades antioxidantes de las antocianinas los convierten en compuestos orgánicos de interés con potencial para neutralizar agentes oxidantes potentes como el NaClO, que presentes en el ambiente, participan en reacciones que representan un riesgo para la salud ambiental.

1.1.6.5. Método de extracción y purificación de antocianinas

Awika *et al.*, (2001) mencionan que el método más adecuado para la extracción de antocianinas es por maceración con solventes acidificados débilmente (etanol, metanol y acetona), debido a que son consideradas moléculas polares. El método implica fases de purificación para extraer sustancias no fenólicas (azúcares, ácidos orgánicos y proteínas) (Catañeda *et al.*, 2009). La extracción de antocianinas con metanol tiene un 20 % más de efectividad (Lee *et al.*, 2004) que con otros solventes. También se ha reportado el uso de disolventes acidificados fuertemente como el ácido fórmico, acético, tartárico, clorhídrico o trifluoracético para extraer antocianinas aciladas, ya que debe evitarse el manejo de medios que las hidrolicen, especialmente con ácidos dicarboxílicos y malónico (García *et al.*, 1998), es por esto por lo que se sugiere la utilidad del ácido acético y ácido fórmico para extraer más y diferentes antocianinas (Kapasakalidis, 1999).

1.1.6.6. Potencial redox de las antocianinas

La eficacia de un antioxidante está relacionada con el potencial de óxido-reducción, la energía de activación y las constantes de velocidad de reacción (Muedas *et al.*, 2008). La función de los antioxidantes es retrasar o aminorar la oxidación de la materia oxidable. Kook *et al.*, (1998) evaluaron la actividad antioxidante de alrededor de 700 plantas de diferentes familias; para el método de neutralización utilizaron el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y distintos compuestos fenólicos y polifenólicos fueron aislados e identificados como potentes antioxidantes.

Como parte de la validación del potencial de los compuestos para ser considerados como alternativas en algún tratamiento de neutralización de la toxicidad de un oxidante, es necesario evaluar el producto de la reacción sobre organismos bioindicadores. Entre los bioindicadores acuáticos se encuentra *D. magna* como uno de los modelos biológicos más utilizados en ecotoxicología, especialmente, para determinar los efectos de contaminantes en afluentes (Mark y Solbé, 1998).

1.1.7. Bioensayos para evaluar la calidad del agua

Los ensayos biológicos son de gran utilidad para un adecuado diagnóstico bajo criterios específicos, experimentales y controlados utilizando organismos de prueba sobre contaminantes físicos y químicos. Las consecuencias se pueden manifestar a diferentes niveles, como inhibición o magnificación; estos cambios tanto, morfológicos, fisiológicos, histológicos, de multiplicación, de proliferación o crecimiento e incluso de muerte, dependerán de la capacidad de respuesta de los organismos (Prat & Munné, 2014). Por otra parte, dependiendo el xenobiótico, la duración, la frecuencia, las propiedades químicas y las concentraciones a las que se exponga el organismo, se definirán el tipo (agudo o crónico) y el grado de toxicidad, esto quiere decir, que un ensayo biológico evaluará la interacción entre el tóxico y el sistema biológico de la biocenosis (Delgadillo *et al.*, 2011). Se debe tener en cuenta que no hay ningún organismo que se use para valorar todos los probables efectos ocasionados en el ecosistema bajo las diferentes condiciones de estrés ambiental, lo que obliga a la selección de aquellos que ofrezcan más información

bajo condiciones particulares. En los bioensayos hay solo algunos organismos modelos (tabla 10) que se pueden emplear, debido a que presentan funciones ecológicas específicas y especiales. Sin embargo, la muestra elegida para ser ensayada puede llegar a tener limitaciones o problemas experimentales para llevar a cabo el ensayo (Castro *et al.*, 2002).

Tabla 10. Material biológico para evaluar la calidad del agua.

ESPECIE	PRUEBA
Cepa de <i>Hydra attenuata</i>	<i>Hydra</i>
Quistes de <i>Artemia salina</i>	<i>Hydra</i> (alimentación)
Semillas de <i>Lactuca sativa L</i>	Semilla
Cepa <i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia</i>
Bulbos de <i>Allium cepa L</i>	Cebolla
Cepa <i>Selenastrum capricornutum</i> (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Algas/o alimentación <i>Daphnia</i>

Fuente: (Castro *et al.*, 2002).

Se han diseñado procesos para evaluar y determinar los resultados negativos de contaminantes a bajas concentraciones y en corto tiempo. El monitoreo biológico continuo a través de bioindicadores es muy significativo para verificar y valorar la calidad del agua, ya que inspecciona los cambios del entorno y los efectos que pudieran resultar en la función biológica de los organismos modelos, como particularidades especiales, y así evaluar el proceso de contaminación ambiental con mayor precisión a diferencia de los que sucedería al utilizar otros organismos del mismo hábitat. Estas especies indicadoras responden con cambios bioquímicos, genéticos, morfológicos y fisiológicos, a la exposición de componentes estresantes ambientales; *Daphnia magna* es considerado un organismo dulceacuícola que es empleado como modelo para pruebas de toxicidad a los contaminantes ambientales (Le *et al.*, 2016).

1.1.8. *Daphnia magna* Straus como organismo modelo ecotoxicológico

D. magna, proviene de la familia de los Daphniidae del grupo de los Arthropoda, Branchiopoda y la clase Crustacea. Pertenece a los ambientes dulceacuícolas y se localizan en las capas superficiales del agua en relación con factores abióticos (Nevesa et al., 2015).

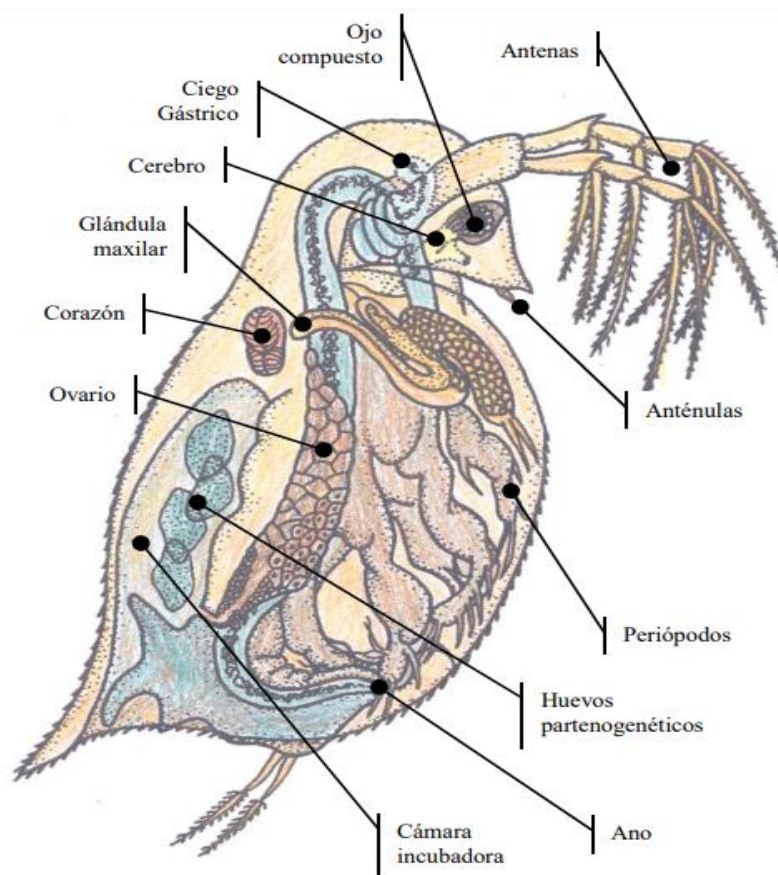


Figura 7. Morfología de *Daphnia magna*. Su cuerpo es transparente, por lo cual, se puede observar a simple vista su aparato digestivo y la cámara de incubación en el caso de las hembras (Mittman et al., 2014).

Su morfología (Figura 7) muestra una forma semejante a la de un frijol, su caparazón es transparente, en la región de la cabeza se localiza un ojo (Antunes y Castro, 2017). Su cuerpo se divide en tres partes (céfalon, pereion y pleon), su caparazón se expande por todo su cuerpo y por debajo de este, las hembras presentan la cámara dorsal de incubación donde se reproducen sus huevos hasta eclosionar como neonatos y posteriormente son liberados de la cámara, mudan y parecen

adultos en miniatura (Mittman *et al.*, 2014). Tiene dos antenas ramificadas con las que pueden nadar y se encuentran a la mitad del cuerpo dentro del caparazón, sus piernas torácicas son planas y las emplea para generar corriente de agua y así trasladar sus alimentos y oxígeno hacia la boca y branquias (Gorokhova *et al.*, 2015).

D. magna, es muy importante en la cadena trófica dado que pertenecen a los consumidores primarios, por lo tanto, es clave de alteraciones que puedan pasar en ecosistemas de agua dulce. Su morfología y comportamiento permiten observar algunas características como el tiempo de maduración sexual, el tamaño corporal, la capacidad de crecimiento poblacional y la reproducción partenogenética (Dodson *et al.*, 1995). En los ecosistemas acuáticos los daños tóxicos que pudieran estar presentes causan variaciones en estas características, que se relacionan con la salud del organismo, por ejemplo, un menor tamaño corporal es consecuencia de la reducción en la tasa alimentaria, pasando a ser consumidores deficientes lo que se puede observar en la cantidad de algas que se encuentren en el agua (Antunes y Castro. 2017).

1.1.8.1. Relevancia de *Daphnia magna* en ecotoxicología

En ecotoxicología, *D. magna* es utilizada como un modelo de prueba debido a (Mark y Solbé, 1998): se pueden evitar diferencias genéticas, al presentar reproducción partenogenética (las hembras producen células diploides con un mismo genotipo). Además, las pruebas de toxicidad crónicas se pueden obtener en poco tiempo, debido a su corto ciclo de vida. *D. magna* representa a la comunidad del zooplancton y son de gran importancia en la cadena trófica de agua dulce, debido a que es uno de los principales consumidores de los productos primarios (Herbert, 1978; Larsson y Donson, 1993). En este sentido en comparación con otros invertebrados dulceacuícolas, muestra mayor sensibilidad ante la presencia de contaminantes (Baudo, 1987), justificando que los daphnidos, se consideran como el bioindicador eficiente para evaluar los efectos de los contaminantes ambientales en el agua Abe *et al.*, (2001).

1.1.8.2. Métodos de prueba con *Daphnia magna*

La norma NMX-AA-087-SCFI-2010 establece la técnica para medir la toxicidad aguda empleando a *Daphnia magna*. Su objetivo principal es evaluar la toxicidad de sustancias solubles en agua, incluyendo cuerpos de agua dulce, aguas residuales, industriales y municipales, efluentes agrícolas, soluciones puras o combinadas y lixiviados solubilizables en suelos y sedimentos. Este método consiste en evaluar la toxicidad mediante la concentración efectiva media (CE₅₀) de manera que, la respuesta sea valorada sobre la inmovilidad o mortalidad en las condiciones expuestas y controladas en el organismo en un lapso de 48 h.

1.1.9 Concentración letal media (CL₅₀) y descripción del método “Probit”

La CL₅₀ es la concentración del tóxico que representa la mortalidad al 50% del organismo a prueba. Castillo, (2004) menciona que si la concentración del tóxico es elevada los neonatos no resistirán las primeras 48 horas, sin embargo, si llegan a sobrevivir más del 50% de los organismos, esto nos indicaría que la muestra es adecuada o tiene baja toxicidad.

Mientras que, el método de unidades probabilísticas (Probit) al 95%, se emplea para establecer la CL₅₀, donde se determina el porcentaje del efecto causado por el tóxico sobre el organismo de prueba mediante la fórmula:

$$\text{Mortalidad (\%)} = \frac{r}{N} \times 100$$

Donde:

N = número de individuos

r = número de organismos muertos o deformes

Las concentraciones de prueba del tóxico empleadas en cada dilución se convierten en escala logarítmica $X = \log^{10}$, para poder conseguir un modelo lineal en la curva que representa gráficamente la relación dosis-respuesta.

1.2. Antecedentes

Diversos estudios han evidenciado el potencial antioxidante de las antocianinas, así como su inocuidad. Ramirez *et al.*, (2006) obtuvieron y caracterizaron el extracto de antocianinas de *R. glaucus* a través de cromatografía de capa fina y espectrofotometría para la extracción, y un análisis de estabilidad al impacto de diversos estímulos ambientales. Además, los bioensayos de toxicidad con *Artemia Sali* mostraron que las antocianinas de *R. glaucus* son cianidina-3-glucósido. Determinaron que la dosis letal media (DL₅₀) del extracto metanólico de *R. glaucus* fue de 223.6 µg/mL y en el bioensayo con *Artemia Sali* lo agrupan dentro de los compuestos moderadamente tóxicos según CYTED. Se determinó que el pigmento es seguro y estable al aplicarse a dos productos lácteos comerciales (leche y kumis) en los cuales mantiene la naturalidad del producto y garantiza la inocuidad. Este estudio evidencia que los extractos naturales pueden tener algún efecto negativo sobre los bioindicadores y hace pertinente su evaluación.

De Lima *et al.*, (2007) estudiaron las propiedades electroquímicas de delfinidina, cianidina, pelargonidina, kuromanina y calistefina mediante voltametrías de pulso cíclico y diferenciales. Además de su capacidad antioxidante mediante la captación de radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y correlacionándolos con su potencial de oxidación. Como resultados describen que hay similitud de actividad antioxidante y el potencial de pico de oxidación voltamétrica cíclica en el caso de los flavonoides. En la recolección de residuos de DPPH evaluados por CE₅₀ mostraron la eficacia de las actividades antioxidantes de los compuestos en el siguiente orden: delfinidina (3.74 CE₅₀), cianidina (4.85 CE₅₀), pelargonidina (5.25 CE₅₀), kuromanina (7.29 CE₅₀) y calistefina (10.9 CE₅₀), lo que indica, que cuanto mayor sea el número de grupos hidroxilo en su estructura de flavonoides, menor es el valor CE₅₀ y muestra mayor actividad antioxidante.

Angela *et al.*, (2001) evaluaron la actividad y mecanismo de las propiedades antioxidantes de la cianidina-3-O-β-glucopiranosido (C-3-G) determinando que su potencial actividad antioxidante que posee es excelente y midiendo por voltamperometría cíclica de corriente continua su potencial redox es de 405 mV esto

demuestra que C-3-G es un agente reductor fuerte que actúa como un poderoso antioxidante.

Victorin *et al.*, (1972) midieron el potencial redox para diferentes compuestos de cloro (**Anexo 8**) determinando que el NaClO presenta 0.56 mV.

Sobre la base de estos resultados del potencial redox, tanto de las antocianinas principalmente la cianidina y el NaClO se demuestra que por su gran diferencia de potenciales (C-3-G 405 mV / NaClO 0.56 mV) hay una gran probabilidad de que la antocianina neutralice el NaClO.

Park *et al.*, (2014) expresaron que los vegetales de la familia Brassicaceae presenta compuestos que favorecen la salud y atenúan los peligros de contraer patologías. En especial *B. oleracea* contiene compuestos antioxidantes lo que incluye diferentes flavonoides (miricetina, luteoina, delphinidina, cianidina, pelargonidina, kaempferol y quercetina), que se consideran benéficos para la salud humana. Por otra parte, Wiczowski *et al.*, (2014), estudiaron las cualidades antioxidantes y antiinflamatorias de un microencapsulado de antocianina extraída de *B. oleracea*, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento junto con detección de diodos y espectrometría de masas en tándem de ionización por electrospray (HPLC-DAD-MS / MS). Comprobaron que contiene otra subclase de flavonoides, 20 antocianinas distintas con la forma de cianidina-3-diglucósido-5-glucósidos. Concluyeron que el microencapsulado de antocianina de *B. oleracea* presenta un poder antioxidante comparable con un control positivo de vitamina C a 50 mg/mL.

Rosales, L. (2019) obtuvo un pigmento alimenticio a partir de las antocianinas responsables del color de la col morada por extracción con solvente. La identificación de los tipos de antocianinas se llevó a cabo por cromatografía de capa fina empleando un sistema de elución, *n*-butanol: ácido acético glacial: agua (40:10:20), con una placa de sílice 60F254. De acuerdo con los *R_f* obtenidos en la cromatografía consiguió identificar cianidina-3,5-diglucósido y peonidina-monoglucósido como los compuestos principales en esta especie. Esta información denota el potencial que tienen las antocianinas de la col morada como neutralizante redox.

Con respecto a la toxicidad del NaClO y el uso de bioindicadores para su evaluación existe información en donde se determina la CL₅₀ y permite una base de referencia para los ensayos del presente trabajo. Martins (2013), evaluó los efectos tóxicos de los desinfectantes hipoclorito de sodio (NaClO) y bronopol (C₃H₆BrNO₄) sobre el crustáceo cladóceros *Daphnia magna*. Las pruebas de toxicidad con NaClO para determinar la concentración letal media (CL₅₀) consistieron en siete concentraciones (0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.08, 0.11 y 0.17 mg/L) y como resultados observó que la CL₅₀ las 24 horas fue de 0.093 mg/L, estando entre los valores de 0.076 y 0.16 mg/L; a las 48 horas fue de 0.062 mg/L y a las 96 h fue de 0.051 mg/L. No fue posible pasar a la prueba crónica, debido a que se encontró que el método por espectrofotometría aplicado no sería el más adecuado considerando las concentraciones utilizadas (0.01-0.17 mg/L) y no fue posible utilizar un intervalo de concentración superiores, debido a que *D. magna* es muy sensible, con una mortalidad del 100% en concentraciones superiores a 0.17 mg/L. Durante el ensayo agudo a las 24 h se presentó una mortalidad de aproximadamente 25, 70 y 100 %, a concentraciones de 0.08; 0.11 y 0.17 mg/L, respectivamente. A 48 horas la concentración de 0.03 mg/L se obtuvo una mortalidad del 5%; en la concentración de 0.08 mg/L fue del 95 % y en las concentraciones de 0.11 y 0.17 mg/L se obtuvo una mortalidad del 100 %. A las 96 horas se alcanzó una mortalidad del 5 % en las concentraciones de 0.02 y 0.03 mg/L; 25 % en la concentración de 0.05 mg/L y 100 % en las concentraciones de 0.11 y 0.17 mg/L. Finalmente la investigación permitió comprobar algunas de las problemáticas de los contaminantes como consecuencia de los impactos ambientales en los consumidores primarios de agua dulce.

Sin embargo, los estudios relacionados con el enfoque de esta investigación son escasos, por lo que es de gran interés conocer el potencial que pudiera tener un compuesto antioxidante como las antocianinas sobre un compuesto oxidante como el NaClO, en términos de neutralización de su toxicidad y su evaluación en un bioindicador como *D. magna*. Por lo tanto, del análisis de la información revisada surgen algunas preguntas de investigación.

1.3. Preguntas de investigación

1. ¿Cuál es la concentración de NaClO de una solución comercial que causa el descenso en la viabilidad de *D. magna* en un 50%?
2. ¿Cuál es el efecto de las antocianinas de *B. oleracea* sobre la viabilidad *D. magna*?
3. ¿Cuál es la concentración de antocianinas de *B. oleracea* capaz de disminuir o anular los iones Cl^- en soluciones de NaClO causantes de la mortalidad del 50% de *D. magna* y con ello neutralizar el efecto tóxico del NaClO en solución?

1.4. Hipótesis

Debido a la función potencial antioxidante de las antocianinas de la *B. oleracea* y al carácter oxidante y altamente reactivo de las soluciones de NaClO comercial, la capacidad redox de las antocianinas será suficiente para neutralizar el efecto tóxico del NaClO sobre la especie bioindicadora *D. magna*.

1.5. Justificación

La actual pandemia ha promovido un incremento importante en el uso de desinfectantes, especialmente de NaClO, por lo que se prevé un posible incremento en el riesgo para la vida acuática por la presencia de este compuesto. El carácter nocivo para el hombre y la vida acuática del tiosulfato de sodio, compuesto que se utiliza por norma para la neutralización del NaClO, crea la necesidad de proponer algún compuesto orgánico natural alternativo, amigable con la salud y el medio ambiente, que pueda ser capaz de neutralizar o disminuir su toxicidad sobre la biota. Con base en esta percepción, esta investigación pretende contribuir con conocimiento acerca del potencial que pueden tener las antocianinas de *B. oleracea*, por sus propiedades antioxidantes, para inhibir la reacción oxidativa de NaClO a las concentraciones comerciales sugeridas para su uso como desinfectante, de carácter oxidante y tóxico, validando el éxito de la neutralización sobre una especie bioindicadora de referencia como *D. magna*. Este conocimiento podrá constituir una base para el diseño en procesos de tratamiento de efluentes contaminados o incluso de tratamientos de protección para la salud.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Determinar el potencial redox de las antocianinas de *B. oleracea* para la neutralización de la toxicidad de NaClO (Cloralex® 5.5%) en soluciones acuosas utilizando a *D. magna* como un bioindicador.

1.6.2. Objetivos específicos

- Caracterizar antocianinas de col lombarda (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) extraídas por cromatografía para su identificación y utilización en las pruebas de neutralización del NaClO (Cloralex® 5.5%).
- Establecer las condiciones de la prueba de toxicidad del NaClO (Cloralex® 5.5%) sobre la viabilidad de *D. magna* para determinar la CL₅₀.
- Determinar los efectos de diferentes concentraciones de antocianinas de *B. oleracea* sobre *D. magna* para conocer posibles efectos adicionales a los causados por el NaClO (Cloralex® 5.5%) durante la prueba de neutralización.
- Determinar la concentración de antocianinas de *B. oleracea* que reduzca la concentración de iones Cl⁻ de NaClO (Cloralex® 5.5%) causante de la CL₅₀, a través de la técnica de yodometría, para establecer las condiciones de neutralización de la toxicidad sobre *D. magna*.
- Determinar el potencial de las antocianinas sobre la disminución de la toxicidad del NaClO (Cloralex® 5.5%) sobre la viabilidad de *D. magna*.

II. METODOLOGÍA

Bioindicador y estandarización de las condiciones de propagación

Los especímenes de prueba específicamente de la cepa *Daphnia magna* Straus, fueron obtenidos del Laboratorio de Recursos Naturales del Centro de Ciencias de Investigación en Genética y Ambiente (CIGyA-UATx). Se iniciaron cultivos con 80 daphnidos adultos hembras. Para ello, se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 1 L de agua reconstituida, donde se reservaron 20 daphnidos por frasco y mantuvieron a un pH de 7-9. El protocolo de limpieza se realizó tres veces a la semana clasificando a los organismos por generación (grávidas y neonatos) en frascos de vidrio con agua reconstituida que era preparada en laboratorio con la finalidad de que los organismos tuvieran una reproducción adecuada y esta no afectara en las pruebas toxicológicas, conservándolos a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), con una calidad de luz fluorescente, blanca y fría, y un fotoperiodo de 16:8 h (luz-oscuridad). La alimentación de los organismos fue con microalgas verdes de la especie *Chlorella vulgaris* el cual se cultivaba en el laboratorio y se les daba cada tercer día. Todas las características acerca del mantenimiento y alimentación del organismo se basan en la NMX-AA-087-SCFI-2010.

Brassica oleracea

La col lombarda fue recolectada en el Mercado Hidalgo, Blvd. Nte. s/n, Cleotilde Torres, La Loma, 72230 Puebla, Pue., en el mes de mayo de 2021, en buenas condiciones con respecto a sus propiedades físicas (tamaño, firmeza, color, sin alguna plaga o en estado de putrefacción). El ejemplar utilizado tenía un diámetro aproximado entre 20 a 25 cm y un peso de 1.120 kg. La mitad (560 g) se lavó manualmente con agua de grifo para eliminar restos de suelo y algunos otros contaminantes, posteriormente, se secó al aire libre y se almacenó en bolsas de plástico libres de contaminantes eliminando el aire con una bomba al vacío, para evitar su descomposición y oxidación.

Extracción de antocianinas

Las antocianinas de *B. oleracea* fueron extraídas de las hojas que fueron maceradas con una mezcla de metanol, agua y ácido clorhídrico al 2% (80:20) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se mantuvo en el sonicador (baño de ultrasonidos) durante 20 min a temperatura ambiente. La solución resultante se filtró recuperando la fase acuosa en un matraz bola de 500 mL y desechando la fase sólida. La solución obtenida se evaporó en un 80% en un rotavapor (Buchi R-200) con baño de calentamiento a 35 °C, hasta obtener un extracto concentrado en antocianinas. Posteriormente se realizó la purificación del extracto para obtener las antocianinas aisladas para su estudio.

Purificación de antocianinas

Una vez obtenida la muestra de antocianinas, se realizaron lavados consecutivos con 50 mL de n-hexano y 50 mL de acetato de etilo en un embudo de separación hasta que la fase orgánica no presentó coloración. Se desechó la fase orgánica y la fase acuosa se recuperó en un matraz bola de 500 mL evaporando los residuos restantes de los solventes en un rotavapor con baño de calentamiento a 35 °C. La solución resultante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 20 g de resina amberlite XAD7HP (20-60 mesh) previamente lavada con agua destilada; la extracción se realizó a temperatura ambiente con agitación constante a 280 rpm durante 2 h, evitando la exposición a la luz para garantizar una máxima absorción de antocianinas. Transcurrido el tiempo, se filtró al vacío desechando el agua madre y recuperando la resina para su desorción. La desorción se llevó a cabo realizando lavados con una solución ácida (metanol al 2% con ácido clorhídrico) y se filtró al vacío hasta que la resina ya no presentó color. La solución colorida se recuperó en un matraz bola de 500 mL y se llevó a sequedad en un rotavapor con baño de calentamiento a 35 °C. Una vez obtenido el extracto a sequedad se prosiguió con la purificación, utilizando una columna de vidrio (30 cm x 3 cm), previamente empaquetada con Sephadex (L-H 20). El extracto se disolvió con 2 mL de agua desionizada y se vertió en la columna para su elución utilizando agua, metanol y ácido clorhídrico a diferentes concentraciones (Tabla 11).

Tabla 11. Concentraciones de elución de soluciones por cromatografía en columna.

Solución	Cantidad
Agua ácida al 1%	100 mL
Agua-metanol ácido al 1%	200 mL (180:20)
Agua-metanol ácido al 1%	100 mL (60:40)
Agua-metanol ácido al 1%	100 mL (40:60)
Agua-metanol ácido al 1%	50 mL (80:60)
Metanol ácido al 1%	200 mL

Para la determinación del tipo de antocianina en *B. oleracea* se aplicó la siguiente fórmula tomando como referencia los valores de *Rf* de la Tabla 12 (Harbone, 1973).

Sistema de elución BAW (2:1:2:2)

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}}$$

Tabla 12. Propiedades de las antocianinas comunes.

Pigmento	Forestal	Rf (%100) en ácido fórmico	BAW	Color visible	visible max. (nm) en MeOH- HCl	Cambio de color con AlCl ₃
Pelargonidina	68	33	80	rojo	520	-
Cianidina	49	22	68	magenta	535	+
Peonidina	63	30	71		532	-
Delfinidina	32	13	42		546	+
Petunidina	46	20	52	Purpura	543	+
Malvidina	60	27	58		542	-

Fuente: (Harbone, 1973).

Estandarización de los bioensayos de toxicidad con NaClO y antocianinas de col lombarda sobre *Daphnia magna*

Para este estudio, se realizó un bioensayo que consistió en evaluar la toxicidad de diferentes concentraciones de NaClO (Cloralex® 5.5%) para determinar la CL₅₀, y el efecto de diferentes concentraciones de las antocianinas de *B. oleracea* sobre la viabilidad de *D. magna* realizándose en dos fases; 1) Verificación de la toxicidad del NaClO sobre *D. magna* y 2) Determinación de la toxicidad de las antocianinas sobre la viabilidad de *D. magna*.

Primera fase. Verificación de la toxicidad del NaClO sobre *D. magna*.

Las concentraciones de NaClO aplicadas fueron 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L, considerando lo sugerido por Ganzo (2013), empleando como control positivo dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) y como control negativo agua reconstituida. Las pruebas se realizaron por triplicado en frascos de vidrio estériles de 100 mL que contenían 30 mL de cada solución. Para determinar la CL₅₀ de NaClO en esta especie, en cada frasco se colocaron 10 daphnidos neonatos de la tercera generación como se indica en la norma NMX-AA-087-SCFI-2010.

Segunda fase. Determinación de la toxicidad de las antocianinas sobre la viabilidad de *D. magna*.

Se utilizaron frascos de vidrio estériles de 100 mL conteniendo 30 mL de solución de antocianina a concentraciones de 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L por triplicado. En cada frasco se colocaron 10 daphnidos como se indica en la norma NMX-AA-087-SCFI-2010, con el fin de validar el uso correcto de los daphnidos como indicador.

Para calcular la CL₅₀ y los límites de confianza al 95% de los resultados, se aplicó estadísticamente el método Probit, el cual facilitó estimar la CL₅₀ adecuando los datos de mortalidad mediante el método de probabilidad para justificar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia. El porcentaje de mortalidad por el efecto tóxico de NaClO y antocianinas se convierten a unidades Probit. La

conversión permitió realizar una regresión lineal adecuada, de manera, que el Probit 0.5 correspondió a la concentración de las soluciones que generaron la muerte del 50% de la población. Finalmente, se obtienen valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad para el cálculo de la CL₅₀ (NMX-AA-087-SCFI-2010).

Determinación de la reacción de neutralización de NaClO con antocianinas de *B. oleracea*

Para determinar las condiciones de la reacción de neutralización de NaClO (Cloralex® 5.5%) con antocianinas se realizó un análisis REDOX por medio de yodometría, de acuerdo con lo establecido en la NMX-K-281-SCFI-2012. La solución de NaClO (Cloralex® 5.5%) en la CL₅₀ como resultado del bioensayo sobre *D. magna* se agregó a las antocianinas en concentraciones de 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L en vasos de precipitado de 50 mL por cada concentración. Para el análisis cuantitativo de la reacción, fue necesario obtener el porcentaje de iones Cl⁻ en cada reacción obtenida.

Cuantificación de iones Cl⁻ por yodometría

Para la cuantificación de iones Cl⁻ en el NaClO comercial (Cloralex® 5.5%) se tomó 1 mL de la mezcla de NaClO con cada concentración de antocianinas y se transfirió a un vaso de precipitado de 50 mL. Se agregaron 10 mL de yoduro de potasio al 10% y 10 mL de ácido acético glacial al 30%, y se dejó reposar 30 s sobre una parrilla con agitación magnética. La solución resultante se tituló con una solución de Na₂S₂O₃ al 0.1 N (previamente estandarizada) en una columna de 50 mL, resultando una tonalidad ámbar. Posteriormente, se adicionaron cinco gotas de solución de almidón al 1%, para cambiar la solución a un color azul oscuro, se tituló nuevamente hasta que la solución se tornó transparente.

Cálculos para determinar la concentración de iones Cl⁻:

El cálculo del contenido de iones Cl⁻ (como Cl₂) se realizó con la fórmula siguiente y se expresó el resultado en porcentaje.

$$\%Cl^- = \frac{V \times N \times 0.355 \times 100}{V_1 \times d}$$

Donde:

Cl^- = contenido de iones Cl^- expresado (%)

V= solución de $Na_2S_2O_3$ empleada en la titulación (mL)

N= normalidad de la solución de $Na_2S_2O_3$ (mg/mL)

V_1 = solución de NaClO (mL)

d= densidad del NaClO (g/mL)

Determinación del potencial de las antocianinas en la atenuación de la toxicidad del NaClO sobre *Daphnia magna*

La determinación del potencial de las antocianinas de *B. oleracea* a concentraciones de 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L para neutralizar la toxicidad del NaClO (cloralex 5.5%) fue utilizando la concentración causante de la CL_{50} sobre *D. magna*. En esta prueba se ocuparon frascos de vidrio estériles de 100 mL, adicionándoles 30 mL de agua reconstituida con la concentración del NaClO y antocianinas correspondiente, las pruebas se realizaron por triplicado. En cada frasco se colocaron 10 daphnidos neonatos de la tercera generación como se sugiere en la norma NMX-AA-087-SCFI-2010. Posteriormente, se determinó la viabilidad del bioindicador a las 24 h.

.

III. RESULTADOS

Identificación de antocianinas

Para 1.12 kg de muestra macerada (*B. oleracea*) se obtuvieron 51.48 g de extracto final (4.59%) que fueron disueltos en 3 mL de agua desionizada para ser eluidos por cromatografía en una columna empacada con Sephadex LH-20 XAD-7HP. Se obtuvieron 15 fracciones coloridas de entre 20-30 mL que fueron llevadas a sequedad para su posterior análisis (Figura 8).



Figura 8. Tonalidades del extracto de la *B. oleracea*. Las fracciones coloridas se obtuvieron como resultado de una cromatografía en columna con Sephadex.

Cromatografía de capa fina

Con el propósito de observar un primer perfil de las antocianinas presente en las fracciones obtenidas se evaporó de la fracción 2 a la 5 (Figura 9). Para determinar la pureza de las fracciones obtenidas se utilizó un sistema de elución con una mezcla de butanol, ácido acético, metanol y agua (BAW) en una proporción de 2:1:2:2 y se utilizó una lámpara UV como revelador. Los resultados de la cromatografía en capa fina sugieren que las fracciones extraídas de la muestra de *Brassica oleracea* solo contienen una antocianina. Al ser coloridas las antocianinas puede ser apreciada a simple vista como se observa en la Figura 10, que corresponde a la placa sin revelar, en donde se percibe el factor de retención a la mitad de la placa en las fracciones 3 y 4.

De igual manera, se muestra la placa revelada con luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm y 366 nm. Estas cromatoplasmas nos permitieron visualizar lo que a simple vista no se apreciaba. En la fracción 2 a pesar de que la antocianina no está presente se aprecian bandas con un factor de retención que llegan a alcanzar la parte superior de la placa. Las siguientes dos fracciones tienen un factor de

retención a mitad de placa, en donde ya se puede observar la presencia de la antocianina, por lo que es más notoria la purificación. En la fracción 5 ya no se nota la presencia de la antocianina, pero si la presencia de compuestos no coloridos.

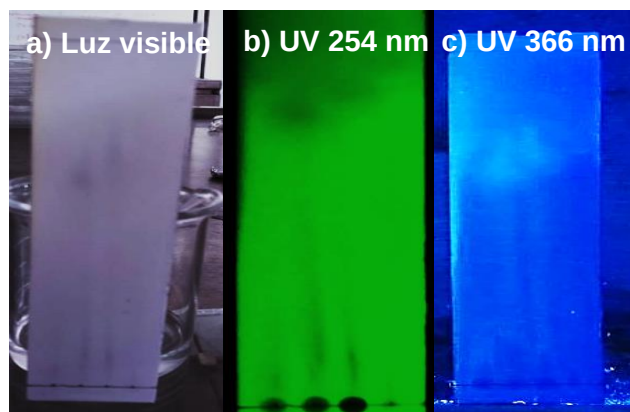


Figura 9. Cromatoplaque de las fracciones F2 a F5. En las tres placas tiene las mismas fracciones de la F2 a la F5, a) la placa se muestra el recorrido de las fracciones a luz visible, b) en la placa se puede visualizar el recorrido de las fracciones, pero con luz Uv 254 nm y c) en la placa apenas logra distinguirse el recorrido de las fracciones con luz UV 366 nm.

Con respecto a la identificación mediante el cálculo de la retención, en la Tabla 13 se muestra la aproximación de la identidad de las antocianinas aisladas tomando como referencia los valores de *Rf* de Harbone (1973) descritas en la Tabla 11.

Tabla 13. Resultados de la cromatografía en BAW y antocianina probable.

Recorrido de la muestra	Recorrido del Eluyente	<i>Rf</i> % F3	Posible Antocianina
4.5	6.5	69.23	Cianidina
4.4	6.5	67.69	Cianidina

Con un factor de retención en la F3 del 69.23% y en la F4 del 67.69% se determinó que la antocianina que constituye el pigmento extraído de *Brassica oleracea* var. *capitata* es la cianidina.

Estandarización de los bioensayos de toxicidad con NaClO y antocianinas de *B. oleracea* sobre *Daphnia magna*

En los bioensayos de toxicidad se evaluó el control negativo (agua reconstituida) y el control positivo ($K_2Cr_2O_7$), sobre el bioindicador *D. magna*.

Tabla 14. Valores de mortalidad del bioindicador *D. magna* expuesto a $K_2Cr_2O_7$.

Concentración (mg/L) NaClO	N Bioindicador	Exposición horas	Media $\pm$ D.E
0.1	30	24	8.0 ± 1.0
0.2	30	24	5.67 ± 0.58
0.4	30	24	10 ± 0.0
0.8	30	24	10 ± 0.0
1.6	30	24	10 ± 0.0
3.2	30	24	10 ± 0.0
T- (H_2O -R)	30	24	0.0 ± 0.0

N= Número de individuos de prueba *D.E.= Desviación Estándar.

La norma mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 recomienda la evaluación de sensibilidad de los organismos ante soluciones de referencia como es el caso del $K_2Cr_2O_7$. En el caso de la prueba de toxicidad aplicada los valores de CL_{50} -24 h se encontró en la concentración de 0.23 mg/L (Figura 10).

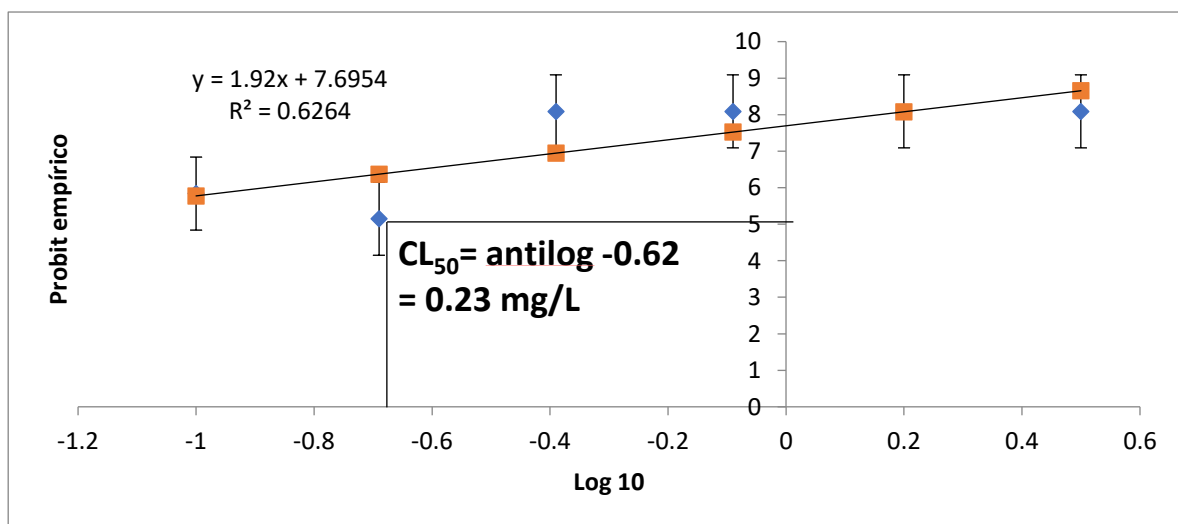


Figura 10. Concentración y Probit empírico del control positivo ($K_2Cr_2O_7$).

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los bioensayos con NaClO (Cloralex® al 3.5 %) registrando la mortalidad de *D. magna*, con la finalidad de determinar la CL_{50} la prueba se llevó a cabo dos veces.

Tabla 15. Registro de mortalidad del bioindicador con NaClO (Cloralex 3.5 %).

Concentración (mg/L) NaClO	N Bioindicador	Exposición horas	Media $\pm$ D.E
0.04	30	24	0.00 ± 0.00
0.08	30	24	0.33 ± 0.58
0.10	30	24	0.33 ± 0.58
0.11	30	24	7.00 ± 1.00
0.12	30	24	7.67 ± 0.58
0.13	30	24	10 ± 0.0
0.16	30	24	9.67 ± 0.58
0.20	30	24	10 ± 0.0
T- (H ₂ O-R)	30	24	0.0 ± 0.0
T+ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	30	24	5.67 ± 0.58

N=Número de individuos de prueba *D.E.= Desviación Estándar.

En la Figura 11, se observa el porcentaje (%) de organismos muertos por el efecto tóxico del NaClO., En el eje "X" se encuentran las concentraciones del del NaClO y en el eje "Y" el porcentaje (%) de mortalidad de *D. magna*. Se aplicó la ecuación de la recta obteniendo una CL₅₀ de 0.11 mg/L.

Figura 11. Concentración y Probit empírico de NaClO.

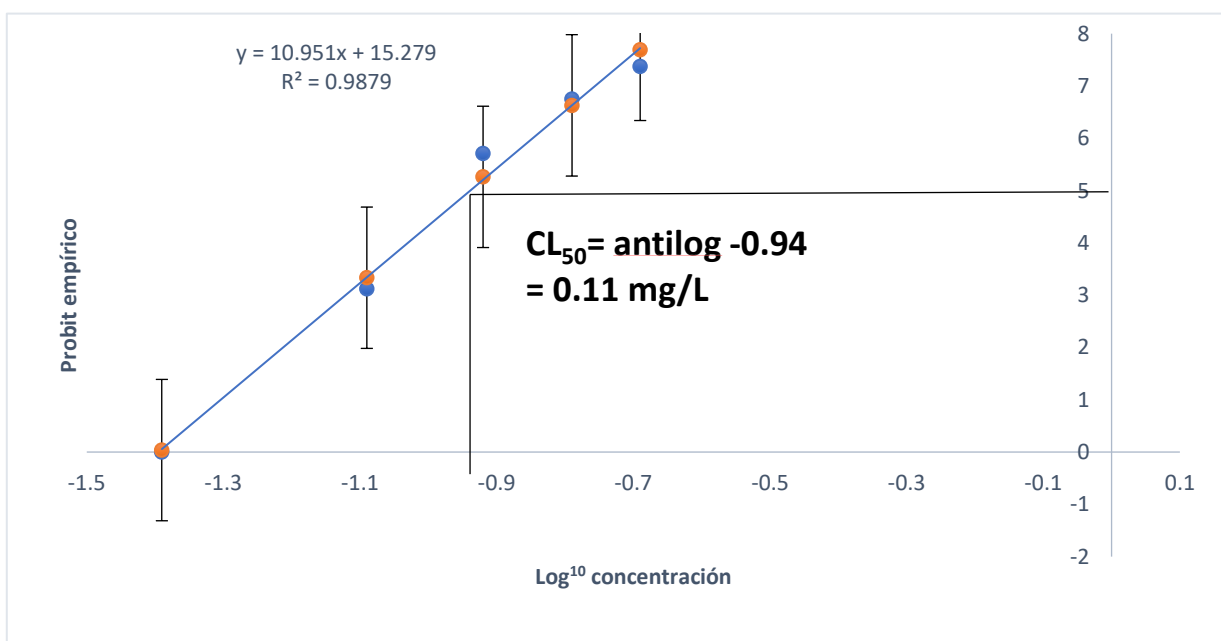




Figura 12. Prueba de toxicidad de NaClO (Cloralex® 3.5%) y antocianinas sobre *D. magna*. 1) en la figura se muestra la preparación del cultivo *Chlorella vulgaris* para la alimentación del organismo, 2) se clasifican los organismos 10 neonatos de la 3ra generación por frasco trabajando para la prueba de toxicidad y 3) en los frascos grandes se colocó *D. magna* grávidas por generación administrándoles su alimento y en los frascos pequeños se colocaron los neonatos con la muestra (NaClO y antocianinas) a evaluar la toxicidad.

En la segunda prueba de toxicidad, se evaluaron cinco concentraciones de antocianinas (0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 mg/L) y dos controles sobre el bioindicador (Tabla 16).

Tabla 16. Valores de mortalidad del bioindicador *D. magna* expuesto a las antocianinas.

Concentración (mg/L) antocianinas	N Bioindicador	Exposición horas	Media $\pm$ D.E
0.04	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.08	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.12	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.16	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.20	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
T- (H ₂ O-R)	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
T+ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	30	24	5.67 $\pm$ 0.58

N=Número de individuos de prueba *D.E.= Desviación Estándar.

En la Figura 13, se observa el potencial de las antocianinas sobre *D. magna*. En el eje "X" se encuentran las concentraciones de antocianinas y en el eje "Y" el porcentaje (%) de mortalidad de *D. magna*. Sin embargo, no se pudo aplicar la ecuación de la recta, debido a que no encontramos algún efecto negativo en cuanto a las concentraciones que se aplicaron para la prueba.

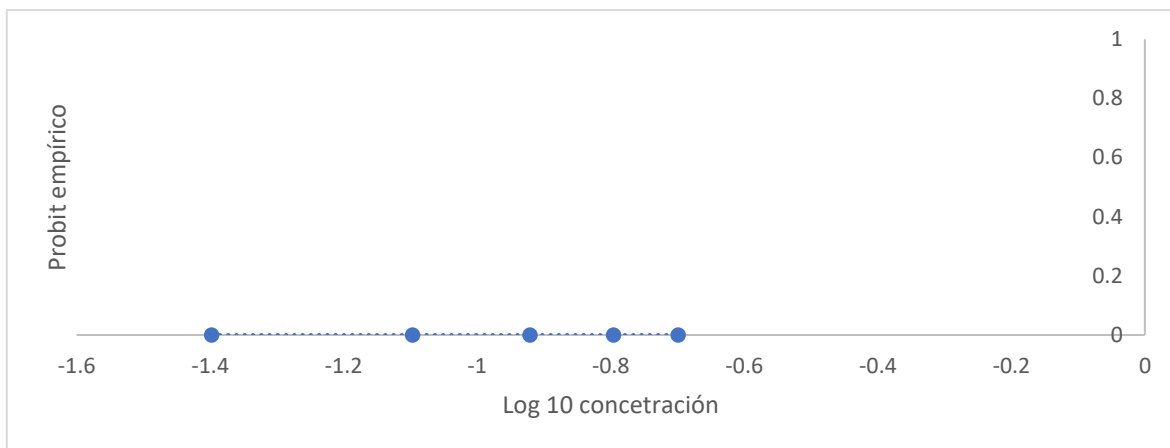


Figura 13. Concentración y Probit empírico de antocianinas.

Determinación del potencial de las antocianinas en la atenuación de la toxicidad del NaClO sobre *D. magna*

Se evaluó la reducción en la toxicidad de NaClO a 0.11 mg/L neutralizado con las diferentes concentraciones (0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 mg/L) de antocianinas sobre *D. magna*. En la tabla 17 se muestra el registro de mortalidad.

Tabla 17. Valores de mortalidad del bioindicador *D. magna* con NaClO neutralizado con antocianinas.

Concentración (mg/L) NaClO + antocianina	N Bioindicador	Exposición horas	Media $\pm$ D.E
0.11 + 0.04	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.11 + 0.08	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.11 + 0.12	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.11 + 0.16	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
0.11 + 0.20	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
T- (H ₂ O-R)	30	24	0.0 $\pm$ 0.0
T+ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	30	24	5.67 $\pm$ 0.58

N=Número de individuos de prueba *D.E.= Desviación Estándar.



Figura 14. Prueba de toxicidad de soluciones de Cloralex + antocianinas sobre *D. magna*. 1) el matraz aforado de color rojo son las antocianinas de *B. oleracea* mientras que el otro matraz tiene la muestra acuosa de NaClO, 2) se muestra la prueba de toxicidad preparada para los resultados en 24 h.

En la Figura 15, se observa el potencial de las antocianinas para neutralizar el efecto tóxico que el NaClO presenta sobre *D. magna*, que no tuvo pérdidas en su viabilidad. En el eje “X” se encuentran las soluciones de antocianinas + NaClO y en el eje “Y” el porcentaje (%) de mortalidad de *D. magna*. Se logró neutralizar el efecto negativo en viabilidad del bioindicador por la aplicación de las diferentes mezclas.

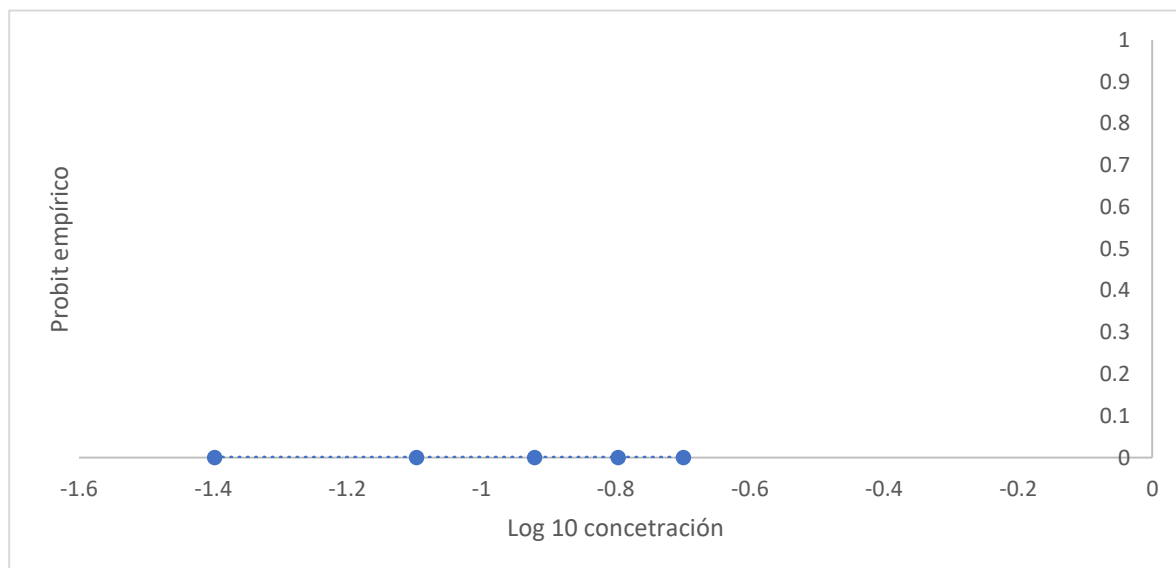


Figura 15. Concentración y Probit empírico.

Determinación por medio de yodometría de la reacción de neutralización de NaClO con antocianinas de col lombarda

Se realizó la cuantificación del ion Cl^- en las mezclas de NaClO a 0.11 mg/L con las cinco concentraciones de antocianinas (0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 mg/L) que se trabajaron en el experimento, agregando 3 concentraciones más (0.005, 0.01, 0.02 mg/L) para corroborar con nuestros resultados con base en la fórmula establecida por la norma NMX-K-281-SCFI-2012. Para comprobar nuestros resultados se realizó la prueba dos veces por triplicado. En la Tabla 18, se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de cloro por concentración de antocianina.

Tabla 18. Cuantificación del ion cloro en solución con antocianinas.

Concentraciones (mg/L) Ion Cl^-	N Bioindicador	Media $\pm$ D.E
0.1	2	3.22 ± 4.55
0.11	2	5.35 ± 7.57
0.005	2	5.20 ± 7.35
0.01	2	4.90 ± 6.92
0.02	2	4.32 ± 6.10
0.04	2	3.50 ± 0.71
0.08	2	2.87 ± 1.22
0.12	2	2.33 ± 0.47
0.16	2	1.16 ± 0.23
0.20	2	0.72 ± 0.23

N=Número de individuos de prueba *D.E.= Desviación Estándar.

En la Figura 16, se aprecia que, entre mayor concentración de antocianinas en la solución de NaClO, el ion Cl^- presente en la mezcla va disminuyendo, lo que sugiere que las antocianinas muestran potencial para neutralizarlo y disminuir el daño oxidativo originado por el NaClO.

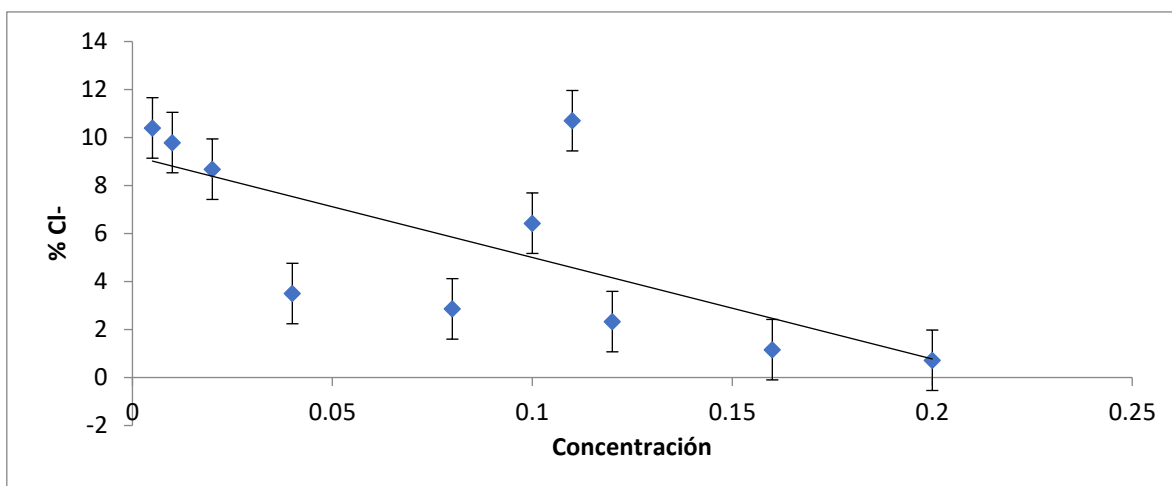


Figura 16. Concentración de NaClO en solución con antocianinas.

IV. DISCUSIÓN

En la literatura se muestran diferentes procesos para obtener el extracto de *B. oleracea*, en el cual están presentes los flavonoides y dentro de los que destacan algunas antocianinas, específicamente la cianidina. Para la extracción de antocianinas se puede llevar a cabo mediante: arrastre de vapor, fluidos supercríticos o extracción por solvente, siendo esta última técnica la más utilizada, los solventes que se usan para la extracción son solventes polares, lo más utilizado son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona acidificados evitando ácidos fuertes y utilizando ácidos orgánicos como; ácido acético, ácido fórmico, ácido tricloroacético (Charfuelan, 2011). Los cromatogramas en capa fina revelan claros contrastes en los contenidos de las antocianinas, así mismo, la pigmentación de un alimento proviene de la naturaleza y concentración de los metabolitos secundarios. La coloración de la hortaliza *B. oleracea* var. capitata se debe a las antocianinas; en nuestros resultados una vez realizada la cromatografía en capa fina, en elución BAW 2:1:2:2 (Tabla 13) tomando como referencia los valores de *R_f* de Harbone (1973), se observó la antocianina por la que está compuesto el pigmento del extracto obtenido de *B. oleracea* es la cianidina. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Wiczowski *et al.* (2014) quienes a través del método HPLC-DAD-MS/MS determinaron que *B. oleracea* cuenta con 20 antocianinas diferentes con la estructura principal de cianidina-3-diglucósido-5-glucósidos. No obstante, en un reporte de investigación sobre el extracto de antocianinas que contiene *B. oleracea*, mediante cromatografía con un sistema de elución BAW (40:10:20) en capa fina; Rosales (2019) consiguió identificar dos tipos de antocianinas, cianidina-3,5-diglucósida y peonidina-monoglucósida. Esto podría sugerir que es necesario probar otras condiciones de extracción para verificar la presencia de peonidina, sin embargo, de acuerdo con nuestra investigación la antocianina “cianidina” es la que está principalmente presente en el extracto de *B. oleracea*.

El NaClO es un compuesto inestable que se descompone fácilmente en cloro y oxígeno (March y Simonet, 2007). En los bioensayos de toxicidad con NaClO (Cloralex 3.5%), pudimos corroborar que entre la concentración 0.08 mg/L y 0.12 mg/L se encuentra la CL₅₀. De acuerdo con lo que indica la norma NMX-AA-087-

SCFI-2010 se utilizó el método estadístico Probit para calcular la CL₅₀. En la Figura 11 y 12 observamos el intervalo lineal de nuestro Probit empírico (% de mortalidad) con las distintas concentraciones de soluciones de NaClO (Log10 de la concentración), y podemos decir que a medida que aumenta la concentración de NaClO también aumenta el número de mortalidad del organismo hasta el 100%. Por lo tanto, la concentración que se obtuvo como CL₅₀ del organismo, se encuentra en la concentración de 0.11 mg/L. En cuanto a lo reportado por la USEPA, (1984), el valor de la CL₅₀ a las 24 h fue de 0.093 mg/L de NaClO encontrándose entre los valores de 0.076 y 0.16 mg/L. Mientras que, a las 48 horas fue de 0.062 mg/L y a las 96 h fue de 0.051 mg/L, teniendo en cuenta que a la concentración 0.17 mg/L *D. magna* se mostraría muy sensible presentando una mortalidad del 100%. Por otra parte, Martins (2013), en el ensayo agudo de toxicidad con NaClO durante las 24 h observó una mortalidad de aproximadamente 25, 70 y 100% de *D. magna* a concentraciones de 0.08; 0.11, y 0.17 mg/L, respectivamente a las 48 h en una concentración de 0.03 mg/L obtuvo una mortalidad del 5%, a la concentración de 0.08 mg/L obtuvo un 95% y a la concentración de 0.11 y 0.17 mg/L obtuvo una mortalidad del 100%, finalmente a las 96 h alcanzó una mortalidad del 5% a concentraciones de 0.02 y 0.03 mg/L, 25% a concentraciones de 0.05 mg/L y 100% a concentraciones de 0.11 y 0.17 mg/L. Concluyendo que la CL₅₀ fue obtenida a las 24, 48 y 96 h a 0.093, 0.062, y 0.051 mg/L. De acuerdo con la directiva de la UE 93/67/CEE los valores encontrados de la CL₅₀ se enmarcan en los compuestos muy tóxicos para los organismos acuáticos ya que están entre 1-10 mg/L según lo reportado por la CE 1272/2008 dice que se consideran valores nocivos para el medio ambiente, ya que son menores a 10 mg/L. Los cambios en las concentraciones a las que se calcularon las CL₅₀ se atribuyen a la variación en las concentraciones del compuesto comercial. Estos tres trabajos coinciden en que el hipoclorito presenta efectos letales y subletales, e incluso a bajas concentraciones resulta ser tóxico, es importante tener en cuenta que el hipoclorito no se encuentra solo en el medio ambiente, sino en conjunto con otros compuestos los cuales podrían potenciar su toxicidad. Por lo tanto, se necesitan más estudios para conocer los efectos que se presentarían a nivel población e incluso a nivel ecosistema.

Se realizó la prueba de toxicidad de antocianinas sobre *D. magna* para determinar y descartar los posibles efectos que le pudieran ocasionar al organismo, adicionales a los causados por el NaClO. En la prueba se trabajaron cinco concentraciones de antocianinas (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L), el control positivo ($K_2Cr_2O_7$) y el control negativo (agua reconstituida) sobre el bioindicador, obteniendo como resultado que a ninguna concentración de antocianinas se observó mortalidad de *D. magna* (tabla 17). Este resultado fue relevante para darle continuidad al trabajo con nuestro objetivo general. Por otra parte, Ramírez *et al.* (2006) llevó a cabo la extracción del colorante de mora de castilla (*Rubus glaucus benth*), del que evaluaron su toxicidad sobre el bioindicador *Artemia salina*. Encontraron cianidina-3-glucósido como las antocianinas presentes en el extracto metanólico de *R. glaucus*. Por otra parte, en la respuesta biológica de *Artemia salina* frente al extracto metanólico se determinó que la dosis letal media (DL_{50}) causada por la antocianina fue de 223.6 $\mu\text{g/mL}$ y lo clasificaron como moderadamente tóxico (100-500 $\mu\text{g/mL}$) según CYTED. En ambos trabajos tanto de *B. oleracea* como *R. glaucus* se reporta la misma antocianina, pero no el mismo efecto tóxico sobre el bioindicador seleccionado, lo que hace más interesante los resultados de la prueba de toxicidad evaluados bajo dos diferentes bioindicadores (*D. magna* y *Artemia salina*).

Cabe mencionar, que debido a que no hay suficientes reportes de investigación en relación con la evaluación de toxicidad de antocianinas con bioindicadores sería relevante llevar a cabo más pruebas de toxicidad con la antocianina de *B. oleracea* y otros bioindicadores a concentraciones superiores a las mencionadas en esta investigación y así complementar información sobre los posibles efectos que pudieran causar las antocianinas sobre otros organismos.

Se determinó el potencial de las antocianinas para disminuir la toxicidad del NaClO sobre la viabilidad de *D. magna*, mediante la realización de la prueba de toxicidad con el organismo, mezclando las antocianinas a diferentes concentraciones (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L) con el NaClO a la concentración 0.11 mg/L causante de la CL_{50} (tabla 16). Como resultado se observa que no hubo mortalidad en ninguna de las mezclas probadas. Por lo tanto, la evidencia muestra que las antocianinas

cumplieron con su efecto neutralizador al reaccionar con un compuesto oxidante, en este caso el NaClO, probado sobre uno de los ensayos biológicos más usados en ecotoxicología y mediante una técnica química. Este estudio abre las posibilidades de investigación del potencial que tienen antocianinas de otras frutas, flores o vegetales como neutralizantes redox de compuestos oxidantes tóxicos que se encuentran en las aguas residuales.

Sin embargo, en una investigación evaluaron la actividad y mecanismo de las propiedades antioxidantes de la cianidina-3-O- β -glucopiranosido (C-3-G) comprobando que posee una excelente actividad antioxidante y evaluando por voltamperometría cíclica de corriente continua su potencial redox es de 405 mV esto demuestra que C-3-G es un agente reductor fuerte que actúa como un poderoso antioxidante (Angela *et al.*, 2001). Por otra parte, Victorin *et al.*, (1972) midieron el potencial redox del NaClO presentando 0.56 mV. Esto quiere decir que, los resultados del potencial redox, de la antocianina (cianidina) y el NaClO por la gran disimilitud de potenciales (C-3-G 405 mV / NaClO 0.56 mV) hay una gran probabilidad de que la antocianina neutralice el NaClO comprobando, así también, con el bioensayo biológico.

Finalmente, la cuantificación del porcentaje del ion Cl en la muestra de NaClO consistió en una volumetría de oxidación-reducción, por lo que se realizó una yodometría. Para incrementar la precisión en los resultados de la prueba, se realizó de manera rápida y evitando la exposición de la muestra a la luz. Para establecer las condiciones de neutralización de la toxicidad de NaClO sobre *D. magna* se determinó la concentración de antocianinas de *B. oleracea* (0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mg/L) capaz de reducir la concentración de iones Cl⁻ de la solución de NaClO que causa la CL₅₀. Considerando que en la cuantificación del ion Cl⁻ por yodometría en una solución de 0.10 mg/L de NaClO se obtuvo un 6.43 % del ion Cl⁻, mientras que en la concentración de 0.11 mg/L fue de 10.70 %, se concluye que cantidades del ion cloro superiores al 10.70 % matará a más del 50 % de *D. magna*. Al agregar las diferentes concentraciones de antocianinas al NaClO a 0.11 mg/L, el porcentaje de iones Cl⁻ disminuyó (tabla 19). A través de este método de

cuantificación se determinó que a la concentración 0.02 mg/L de antocianinas de *B. oleracea* se redujo hasta un 93 % de la concentración de los iones Cl^- en las soluciones de NaClO de 0.11 mg/L. Este resultado es prometedor, debido a que la concentración de las antocianinas de col morada que se requiere para neutralizar NaClO es baja y podría permitir desarrollar un proceso factible para el tratamiento de residuos de NaClO.

V. CONCLUSIONES

- La cianidina es la principal antocianina presente en el extracto de *B. oleracea*.
- Concentraciones de NaClO mayores a 0.11 mg/L causaron un porcentaje de mortalidad del bioindicador superior a 50. Por su parte, ninguna de las concentraciones de antocianinas de *B. oleracea* probadas en este estudio causó efectos negativos sobre la viabilidad de *D. magna*.
- Las antocianinas de *B. oleracea* a todas las concentraciones probadas neutralizaron la toxicidad del NaClO a 0.11 mg/L permitiendo la viabilidad del 100% del bioindicador.
- La concentración de 0.02 mg/L de antocianinas de *B. oleracea* logró reducir en un 93% la concentración de iones Cl^- de las soluciones de NaClO de 0.11 mg/L, causante de la mortalidad del 50% de *D. magna*

VI. PERSPECTIVAS

Se requiere de estudios para la caracterización de las posibles reacciones de las antocianinas de *B. oleracea* que puedan presentar al estar en contacto con NaClO, o la participación de las antocianinas como catalizadores, es decir, que las antocianinas principalmente la cianidina retarde la reacción redox con el NaClO.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE T.A., SAITO H., NIIKURA Y., SHIGEOKA T. Y NAKANO Y. (2001). Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere* 45, 487-495.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2010. Toxicological Profile for Chlorine. Atlanta, GA: U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service.
- Aguilera-Ortiz M., Reza-Vargas M., Chew-Madinaveita R. G., & Meza-Velázquez, J. A. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*, 13(2), 16-22
- Alamilla Beltán, I., Solano Doblado, I. G., & Jiménez Martínez, C. (2016). Col morada (*brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) como indicador de ph. innovación tecnológica para la seguridad alimentaria, 406 – 409
- Alarcón Lema, M. J. (2019). *Variación de la Concentración del hipoclorito de Sodio por Cambio de Almacenamiento, 2018* (Bachelor's thesis, Universidad Nacional de Chimborazo, 2019).
- Angela Maria Amorini, Giovanna Fazzina, Giuseppe Lazzarino, Barbara Tavazzi, Donato Di Pierro, Roberto Santucci, Federica Sinibaldi, Fabio Galvano & Giacomo Galvano (2001) Actividad y mecanismo de las propiedades antioxidantes de la cianidina-3-O- β -glucopiranosido, *Libre Investigación radical*, 35:6, 953-966, DOI: [10.1080/10715760100301451](https://doi.org/10.1080/10715760100301451)
- Antunes, S.C., Castro, B.B. (2017). Pulgas-de-água (*Daphnia* spp.). *Ciência Elem*, 5(4), 1-5.
- Arce, V. A., Dávila, D. L., Carbajal, J. D., Gil, J., Ramírez, L., & Cayo, H. (2015). Biooxidación de tiosulfato como mecanismo indirecto para la lixiviación de minerales mediante cepas nativas acidófilas. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 18(35).
- Aylmore, D. M. (2001). Thiosulfate leaching of gold—A review. *Minerals Engineering*.14(2), 135-174. sciencedirect.com.
- Baker JT. Material Safety Data Sheet. Sodium Hypochlorite Solution [en línea]. Fecha de publicación mayo de 2000, actualizado febrero de 2003 [citado julio 25 de 2003]. Disponible en: <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/S4106.htm>
- Ballesteros Fortich, I. P., & Diaz Barros, A. P. (2017). La antocianina como sustituto de los indicadores de ph sintéticos: un paso hacia los productos verdes. barranquilla, atlántico, colombia.
- Barrera Borio, M. S., Caram, J., & Peña, G. R. (2016). Verificación del ph de diferentes soluciones de hipoclorito de sodio. *Revista de la Facultad de Odontología*, 10(1).
- Basic guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures. European Commission Directorate-General Enterprise and Industry
- BAUDO, R. (1987). Ecotoxicological testing with *Daphnia*. En *Daphnia* (Edited by R.H. Peters and R. de Bernardi). Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 45, 461-48

- Bell, D. R. y K. Gochenaur. (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology*. 100, 1164–1170.
- Benavides, A. Et al. *Tratado de Botánica Económica Moderna*. México: s.n., (2010). ISBN 968844-050-7.
- Bermúdez Quiroz, I. (2013). Estudio comparativo entre el hipoclorito de sodio y la clorhexidina como agentes irrigadores bactericidas en el tratamiento de conductos radiculares en dientes in vitro (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad Piloto de Odontología).
- Bernard M. et Busnot F. *Usuel de chimie générale et minérale*. Dunod, Paris, 1996, pag. 195 (en francés).
- Castillo Gabriela M 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados Y Aplicaciones. 1era edición, Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. México DF. ISBN 968-5536-33-3
- Castro-Muñoz, R., Yáñez-Fernández, J., & Fíla, V. (2016). Compuestos fenólicos recuperados de subproductos agroalimentarios utilizando tecnologías de membrana: una descripción general. *Química de los alimentos*, 213, 753-762.
- Castro Scarone, S., Espínola Molledo, J.C., Migue Caramés, D. y Viana Matturro, F., (2002). *Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay*, Informe final, International Development Research Centre (IDRC), File 04464, Canadá.
- Causil V., L., Coronado G., J., Verbel M., L., Vega J., M., Donado E., K., & Pacheco G., C. (2017). Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 11(1), 97-104. Recuperado de: <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5662>
- Charfuelan, C. (2011). Estudio químico de la fracción de polifenoles tipo antocianina aislada del fruto de Ivilan (*Monoma obtusifolia*), estabilidad y capacidad antioxidante in vitro. [Tesis de pregrado, Universidad de Nariño]. Repositorio institucional- Universidad de Nariño
- Charron, C. S., Clevidence, B. A., Britz, S. J., & Novotny, J. A. (2007). Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. capitata). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 5354-5362.
- Conagua, Semarnat, SINA. www.conagua.gob.mx/Contenido.aspx?n1=3&n2=60&n3=60. Conagua, Semarnat, SINA. México. 2015b
- Davise, G. Et al. *Brassica oleracea* var. capitata L. Trópicos [en línea], 2015. [Consulta: 20 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/4100072?langid=66>.
- Delgadillo-López, A. González-Ramírez, C. Prieto-García, F. Villagómez-Ibarra, J. Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Revista Tropical and Subtropical Agrecosystems*, 14(2011). Pág. 597. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n2/v14n2a2.pdf>
- Department Health, Safety and Environment. (2020). Ficha de datos de seguridad, tiosulfato de sodio, (2) HN25.

- Directiva 93/67/CEE de la Comisión, de 20 de julio de 1993 por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo. DOCE 08.09.93
- Divisa Química (2018). Ficha de datos de seguridad. Actualizado febrero 2021. Disponible en: <http://www.divisaquimica.com>
- Dodson, S., Hanazato, T. (1995). Commentary on Effects of Anthropogenic and Natural Organic Chemicals on Development, Swimming Behavior, and Reproduction of Daphnia, a Key Member of Aquatic Ecosystems. *Environmental Health Perspectives*, 103(4), 7-11.
- Dyrby, M., Westergaard, N., & Stapelfeldt, H. (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food chemistry*, 72(4), 431-437.
- Epa, u. (21 de marzo de 2017). united states environmental protection agency. obtenido de <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry#twelve>
- Estrela C et al. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite [en línea]. Enero de 2002 [citado julio 30 de 2003]. Disponible en [http://www.forp.usp.br/bdj/bdj13\(2\)/v13n2a07/v13n2a07.html](http://www.forp.usp.br/bdj/bdj13(2)/v13n2a07/v13n2a07.html)
- Fornaris, G. Conjunto tecnológico para la producción de repollo características de la planta. [en línea], 2014. pp. 4. [Consulta: 19 mayo 2018]. Disponible en: <http://136.145.11.14/eea/wp-content/uploads/sites/17/2016/04/2.-REPOLLOCARACTERISTICAS-DE-LA-PLANTA-v.-2014.pdf>
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol science*, 11(4), 147-157.
- Fundación universitaria iberoamericana. Composición nutricional de la col morada. Funiber [en línea], 2017a. [Consulta: 17 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.composicionnutricional.com/alimentos/COL-MORADA-5>.
- Garzón, g. a. (2008). las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *acta biológica colombiana*, 27-36.
- Garzón, G. A. (2008). las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *acta biológica colombiana*, 27-36.
- González Mañas, J. M. (2016). Curso orientado a estudiantes de bioquímica y biología molecular. obtenido de <http://www.ehu.eus/biomoleculas/index.htm>
- Gonzalo, R. (2015). Extracción de las antocianinas de col lombarda. Universidad Rafael Landívar.
- Gorokhova, E., Rivetti C., Furuhaugen, S., Edlund, A., Ek, K., Breitholtz, M. (2015). Bacteria-Mediated Effects of Antibiotics on Daphnia Nutrition. *Environ. Sci. Technol*, 49(9), 5779-5787.
- Gould K., Davies K., Winefield C. (2009). Antocyanins. Biosynthesis, Functions and Applications., Springer New York: New Zealand. p. 345.
- Gullón, P.; Eibes, G.; Lorenzo, J.M.; et al. (2020). Green sustainable process to revalorize purple corn cobs within a biorefinery frame: Co-production of bioactive extracts. *Science of The Total Environment* 709, 136236.

- Gürses, A., Acikyildiz, M., Günes, K., y Gürses, M. (2016). Dyes and pigments. En SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability. Springer.
- Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (1998) Hypochloriteinduced damage to proteins: formation of nitrogencentred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.*, 332, 617-625.
- Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (1999) Hypochloriteinduced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.*, 340, 539-548.
- HEBERT P.D.N. (1978). "The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biol. Rev.* 53, 387-426.
- Heinecke, J., Li, W., Daehnke, H., and Goldstein, J. (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J. Biol. Chem.*, 268, 4069-4077.
- Hemachandra, C.K. y A.Pathiratne. (2016). Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 131, 54-64. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.05.010
- Hernandez Vargas, O., Mancilla Villa, Ó. R., Palomera Garcia, C., Olguin Lopez, J. L., Flores Magdaleno, H., Can Chulim, Á., ... & Sánchez Bernal, E. I. (2020). Water and riverbank quality assessment in two tributary basins of the Tuxcacuesco river, Jalisco, Mexico. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 36(3), 689-701.
- Hurrell, J., Ulibarri, E., Delucchi, G., y Pochettino, M. (2009). Hortalizas: Verduras y legumbres. En Repollo (págs. 144-145). Buenos Aires, Argentina: LOLA.
- Ignacio, I.; Volf, I.; Popa, VI Una revisión crítica de los métodos de caracterización de compuestos polifenólicos en frutas y hortalizas. *Química alimentaria* 2011, 126 , 1821–1835.
- Instituto del Cloro. Noticias nuevas. Sodium Hypochlorite Incompatibility Chart [en línea]. Fecha de publicación desconocida [citado julio 30 de 2003]. Disponible en: http://www.cl2.com/whats_new/NaOClCompatChart.pdf
- Juárez, R.P. y O.N. Lucas. (2001). Complicaciones ocasionadas por la infiltración accidental con una solución de hipoclorito de sodio. *Rev. Asoc. Dental Mex.* 58(5), 173-176.
- Kahkonen M. P., Heinamaki J., Ollilainen V. & Heinonen M. 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14),1403-1411.
- Kamiloglu, S. Et al. (2015). Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(9), 21555-21574. [Consulta: 27 mayo 2018]. DOI 10.3390/ijms160921555.
- Kirck & Othmer. (2000). Enciclopedia of Chemical Technology; Volumen 2, Hexanes to Ion Exchange; Interscience Publishers; Jhon Wiley & Sons, Inc.; New York, U.S.A.

- Kuskoski, E. M., A. G. Asuero, M. C. García-Parilla, A. M. Troncoso y R. Fett. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 24(4), 691-693.
- LARSSON P. Y DODSON S. (1993). "Chemical communication in plankton animals." *Arch. Hydrobiol.* 129, 129-155.
- Le, Q.A.V., Sekhon, S.S., Lee, L., Ko, J.H., Min, J. (2016). Daphnia in water quality biomonitoring - "omic" approaches. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8(1), 1-6.
- MAGRAMA. (2014). Anuario de Estadística Agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones>
- Manahan, S.E. (2007). Introducción a la Química Ambiental. Ed. Reverte, Barcelona.
- Manual acuático de la OIE. (2012). Métodos de desinfección de los establecimientos de acuicultura. Capítulo 1.1.3.
- March, J.G., Simonet, B.M. (2007). A green method for the determination of hypochlorite in bleaching products based on its native absorbance. *Science Direct, Talanta* 73: 323-236
- MARK U. Y SOLBÉ J. (1998). "Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (eat) database V- the relevance of Daphnia magna as a representative test species." *Chemosphere* 36(1), 155-166.
- Martins, J. G. (2013). Efeitos tóxicos de biocidas (hipoclorito de sódio e bronopol) no crustáceo cladóceros Daphnia magna.
- Menzies, I. J., Youard, L. W., Lord, J. M., Carpenter, K. L., van Klink, J. W., Perry, N. B., . . . Gould, K. S. (2016). Leaf colour polymorphisms: a balance between plant defence and photosynthesis. *Journal of Ecology*, 104(1), 104-113. doi: <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12494>
- Mittmann, B., Ungerer, P., Klann, M., Stollewerk, A., Wolff, C. (2014). Development and staging of the water flea Daphnia magna (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. *EvoDevo*, 5(12), 2-19.
- Moreu, M. Col lombarda. [en línea], (2015). [Consulta: 18 mayo 2018]. Disponible en: <https://www.lechepuleva.es/aprende-a-cuidarte/tu-alimentacion-de-la-a-z/c./col-lombarda>.
- Muedas Taipe, G., La Rosa Toro Gómez, A., & Robles Caycho, J. (2008). Evaluación electroquímica de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de la Bauhinia guianensis var. kuntiana Aubl. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74 (4), 233-246.
- National Center for Biotechnology Information. . (2017, Marzo 18). PubChem Compound Database; CID=24477. Recuperado de pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
- Nevesa, M., Castroa, B.B., Vidala, T.T., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Goncalves, F., Goncalves, A.M.M. (2015): Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, Daphnia longispina, to a commercial formulation of a

- herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological Indicators*, 53: 220–230.
- Nightingale, Z. D., Lancha, Jr., A. H., Handelman, S. K., Dolnikowski, G. G., Busse, S. C., Dratz, E. A., Blumberg, J. B., and Handelman, G. J. (2000) Relative reactivity of lysine and other peptide-bound amino acids to oxidation by hypochlorite. *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 425-433.
- NMX- AA-087-SCFI-2010. (2010). ANALISIS DE AGUA-EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea-Cladocera)-METODO DE PRUEBA. Diario Oficial de la Federación. México 3 de marzo de 2011.
- NMX-K-281-NYCE-2018. (2018). Método de prueba para la determinación de la concentración de hipoclorito de sodio en solución.
- NOM-052-SEMARNAT-2005. (2005). Norma Oficial Mexicana, que establece las características de los residuos peligrosos y el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.
- NOM-127-SSA1-2017. (2017). Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad de agua.
- Norma de referencia mundial en métodos de análisis de aguas. (2013). Reacciones de Neutralización del Cloro y otros agentes clorantes en Aguas con Tiosulfato de sodio. Lepton S.A.
- Núñez, A. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública*. 37 (suppl.): 644-60
- Ocampo, R., Rios, I., Betancur, I., & Ocampo, D. (2008). Curso práctico de química orgánica. enfocado a la biología y alimentos. caldas: universidad de caldas.
- OPS, OMS. (2020). Recomendaciones para la preparación de soluciones de desinfección.
- Pathiratne, A., C.K. Hemachandra y N. De Silva. (2015). Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. *Environ. Monit. Assess.* 187(12), 1-12. Doi: /10.1007/s10661-015-4954-z
- Po-chia Hsia R., Lynn Hunt, Thomas R. Martin, Barbara H. Rosenwein and Bonnie G. Smith (2007). The making of the west, peoples and culture, a concise history. Volume II: Since 1340, Second Edition. New York: Bedford/St. Martin's. 685.
- Prat, N., & Munné, A. (2014). Biomonitorio de la calidad del agua en los ríos ibéricos: lecciones aprendidas. *Limnetica*, 33 (1), 47-64.
- Prutz, W. A. (1998) Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, 349, 183-191.
- Ramallo, R.S. (2012). Tratamiento de Aguas Residuales. Edición Revisada, pp. 437-439. Ed. Reverté S.A.. Barcelona. España.
- Ramos, E., López, O. (2019). Extracción y Microencapsulación de antocianinas a partir de col morada (*Brassica oleracea* L.). Tesis de licenciatura. Universidad técnica del Ambato, Ecuador.

- Ramos, L. A., Prieto, K. R., Cavalheiro, É. T. G., & Cavalheiro, C. C. S. (2005). Determination of hypochlorite in bleaching products with flower extracts to demonstrate the principles of flow injection analysis. *Journal of chemical education*, 82(12), 1815.
- Richardson, S. D.; Plewa, M. J.; Wagner, E. D.; Schoeny, R. y DeMarini, D. M. (2016). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 636. 178–242.
- Rodier, J. (2015). Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ed. Omega. Barcelona.
- Rodríguez, C., & María, D. (2017). Gestión del riesgo ambiental en almacenamiento y comercialización de productos químicos. *Producción+ Limpia*, 12(1), 24-32.
- Rojas, S., & Vibrans, H. (2004). Catálogo de Malezas de México: Familia Brassicaceae (Cruciferae).
- Rosales, L. G. (2019). Extracción de las antocianinas de la col lombarda. *Revista Ingeniería y Ciencia*, 1(11).
- Royal Society of Chemistry . (2015). Sodium thiosulfate. Recuperado de chemspider.com.
- Shipp J. & Abdel-Aal E. S. M. (2010). Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The open food science journal*. 4(1), 7-22.
- Shrivastava, D. (2015). Cytotoxic effects of paper mill effluent on *Allium cepa* L. *Int. J. Multidiscip. Res. Dev.* 2(2), 657-661.
- Skoog, D., & West, D. 2002. Introducción a la química analítica . barcelona, bogotá, buenos aires, caracas, mexico: revertés s.a.
- Spickett, C. M., Jerlich, A., Panasenko, O. M., Arnhold, J., Pitt, A. R., Stelmazynska, T., and Schaur R. J., (2000) The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta. Biochimica. Polon/ca.*, 47, 889-899.
- Valencia-Arredondo, J.A. (2015). Sistema de un diseño electroforético en flujo libre para purificar antocianinas de col morada (*Brassica oleracea*) (Tesis de maestría). Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Valencia-Arredondo, J.A. (2015). Sistema de un diseño electroforético en flujo libre para purificar antocianinas de col morada (*Brassica oleracea*) Tesis de maestría. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Victorin, K., Hellström, KG y Rylander, R. (1972). Medidas de potencial redox para determinar el poder desinfectante del agua clorada. *Epidemiología e infección* , 70 (2), 313-323.
- WCSP. (16 de agosto de 2018). Plants of the world online. Obtenido de <http://apps.kew.org/wcsp/>

- Wiczowski, W., Topolska, J., & Honke, J. (2014). Anthocyanins Profile And Antioxidant Capacity Of Red Cabbages Are Influenced By Genotype And Vegetation Period. *Journal Of Functional Foods*, 7, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.011>
- Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., y Topolska, J. (2015). Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. *Food Chemistry*, 167, 115-123.
- Wu, X.; Beecher, GR; Holden, JM; Haytowitz, DB; Gebhardt, SE; Previo, RL Concentraciones de antocianinas en alimentos comunes en los Estados Unidos y estimación del consumo normal. *J. Agric. Química alimentaria* 2006, 54 , 4069–4075.
- Yilmaz, Y. y R. T. Toledo. (2004). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology*. 15: (9): 422-433.
- Zhang K-M., Yu H-J., Shi K., Zhou YH., Yu J Q. & Xia X. J. (2010). Photoprotective Roles of Anthocyanins in Begonia Semperflorens. *Plant Sci*. 179:202-208.
- Kook L., Mbwambo Z., Chung HaSook, Luyengi L., Gamez E., Mehta R., Kinghorn D., Pezzuto J., (1998). *Combinatorial Chemistry & High Troughput Screening*; 1: 35-46.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. El gráfico que se diseña muestra en el eje de las abscisas el $\log^{10}$ de la concentración el tóxico (x) y en el eje de las ordenadas el Probit empírico (y). Se tendrá una dispersión de puntos para analizarlos con un análisis de regresión lineal, mediante la siguiente ecuación:

$$Y = a + bx$$

En unidades Probit el 5 corresponde al 50 % de mortalidad ($Y = 5$), este se estima con el modelo calculado de la concentración o dosis del tóxico.

$$5 = a + bx$$

La concentración (x), se despeja: $x = \frac{5-a}{b}$

Se resta la unidad a la concentración obtenida, inicialmente en la transformación logarítmica:

$$x = \left(\frac{5-a}{b} \right) - 1$$

Para finalmente obtener la CL_{50} se aplica antilogaritmo:

$$CL_{50} = \frac{\left(\frac{5-a}{b} \right) - 1}{\text{antilog}}$$

Anexo 2. Relación del porcentaje (%) de mortalidad y el Probit.

% mortalidad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	5.28	5.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.373	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Anexo 3. Registro de mortalidad del bioindicador con K₂Cr₂O₇.

Concentración (mg/L)	Log10 []	Organismos expuestos	Mortalidad			Mortalidad Observada	% Mortalidad	Probit	Probit
			R1	R2	R3			empírico (PE)	calculado (PC)
0.1	-1	30	7	8	9	24	80	5.84	5.77
0.2	-0.69	30	6	5	6	17	56.6	5.15	6.37
0.4	-0.39	30	10	10	10	30	100	8.09	6.94
0.8	-0.09	30	10	10	10	30	100	8.09	7.52
1.6	0.20	30	10	10	10	30	100	8.09	8.07
3.2	0.50	30	10	10	10	30	100	8.09	8.65
T- (H2O)	-	30	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 4. Registro de mortalidad del bioindicador con Cloralex® (3.5%).

Concentración (mg/L)	Log10 []	Organismos expuestos	Mortalidad			Mortalidad Observada	% Mortalidad	Probit	Probit
			R1	R2	R3			empírico (PE)	calculado (PC)
0.04	-1.39	30	0	0	0	0	0	0	0.13
0.08	-1.09	30	0	1	0	1	3.33	3.12	3.41
0.12	-0.92	30	7	8	8	23	76.66	5.71	5.27
0.16	-0.79	30	10	9	10	29	96.66	6.75	6.69
0.2	-0.69	30	10	10	10	30	100	7.373	7.79
T- (H ₂ O-R)	1.47	30	1	0	0	1	3.33	3.12	31.49
T+ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	-0.62	30	6	5	6	17	56.6	5.15	6.37

Anexo 5. Registro de mortalidad del bioindicador con Cloralex® (3.5%).

Concentración (mg/L)	Log10 []	Organismos expuestos	Mortalidad			Mortalidad Observada	% mortalidad	Probit	Probit
			R1	R2	R3			empírico (PE)	calculado (PC)
0.08	-1.09	30	0	0	0	0	0	0	-0.86
0.09	-1.04	30	0	0	0	0	0	0	1.43
0.1	-1	30	0	0	1	0	3.33	3.12	3.27
0.11	-0.95	30	9	8	7	24	80	5.84	5.56
0.12	-0.92	30	10	10	10	30	100	8.09	6.94
0.13	-0.88	30	10	10	10	30	100	8.09	8.78
T- (H ₂ O-R)	1.47	30	0	0	0	0	0	0	0
T+ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	-0.62	30	6	5	6	17	56.6	5.15	6.37

Anexo 6. Registro de mortalidad el bioindicador con antocianinas.

Concentración (mg/L)	Log10 []	Organismos expuestos	Mortalidad			Mortalidad Observada	% Mortalidad	Probit	Probit
			R1	R2	R3			empírico (PE)	calculado (PC)
0.04	-1.39	30	0	0	0	0	0	0	0
0.08	-1.09	30	0	0	0	0	0	0	0
0.12	-0.92	30	0	0	0	0	0	0	0
0.16	-0.79	30	0	0	0	0	0	0	0
0.2	-0.69	30	0	0	0	0	0	0	0
T- (H ₂ O-R)	1.47	30	0	0	0	0	0	0	0
T+ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	-0.62	30	6	5	6	17	56.6	5.15	6.37

Anexo 7. Registro de mortalidad del bioindicador con NaClO® expuesta con antocianinas.

Concentración (mg/L)	Log10 []	Organismos expuestos	Mortalidad			Mortalidad Observada	% Mortalidad	Probit	Probit
			R1	R2	R3			empírico (PE)	calculado (PC)
0.11 + 0.04	-1.39	30	0	0	0	0	0	0	0
0.11 + 0.08	-1.09	30	0	0	0	0	0	0	0
0.11 + 0.12	-0.92	30	0	0	0	0	0	0	0
0.11 + 0.16	-0.79	30	0	0	0	0	0	0	0
0.11 + 0.2	-0.69	30	0	0	0	0	0	0	0
T- (H ₂ O-R)	1.47	30	0	0	0	0	0	0	0
T+ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	-0.62	30	6	5	6	17	56.6	5.15	6.37

Anexo 8. Poder desinfectante del agua clorada y el potencial redox medidos simultáneamente para diferentes compuestos de cloro.

Chlorine compound	Available chlorine (r)	Redox potential before addition of bacteria (r)
NaOCl	0.77	0.56
NH ₂ Cl	0.98	0.62
NHCl ₂	0.89	0.86
Halazone	0.67	0.89
Chloramine T	0.97	0.66
Cyanuric acid + NaOCl	0.84	0.63
Cyanuric acid + NH ₂ Cl	0.63	0.67