



7527/254.18b

## INFORME DE ESTUDIO

### EMPRESA SOLICITANTE

**SUCCESS WORLD, S.L.**  
**C/ Alfonso 12 nº 38-4.1.**  
**28014 Madrid**

### COORDINADOR

ILERSAP-Servei Anàlisi el Pla, S.L.U.  
Crta LL-11, km 9  
C/ Ivars d'Urgell, nº 65  
Edifici Neoparc 2, 4<sup>a</sup> Planta  
25191 Lleida

### MATERIAL QUE PRESENTA

1 Muestra con referencia: ECOFIRE (Ref. interna: 032/18).

### FECHA DE RECEPCIÓN DEL MATERIAL

1/06/18

### TRABAJO QUE SOLICITA

Determinación de Toxicidad aguda en dafnias.

### FECHA DE INICIO

11/06/18

### FECHA DE FINALIZACIÓN

13/06/18

---

Los resultados de este informe conciernen exclusivamente a las muestras, productos o materiales entregados al LABORATORIO e indicados en el apartado "material que presenta".

La reproducción de este informe solo es autorizada si se hace en su totalidad. Este documento consta de 11 páginas de las cuales 9 son anexos.

---

7527/254.18b

La determinación de la toxicidad aguda en dafnia (*Daphnia magna*) ha sido llevada a cabo según el método operativo MO 03 basado en el método OCDE 202 (2004) (*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test).

El resultado obtenido es el siguiente:

Muestra (Ref)	<i>Daphnia magna</i>			
	CE <sub>50</sub> (24h) (g/L)	<i>p</i> <sub>0,05</sub>	CE <sub>50</sub> (48h) (g/L)	<i>p</i> <sub>0,05</sub>
<b>ECOFIRE</b>	13,8	10,8–17,8	6,0	4,6–7,9

Terrassa, 25 Junio de 2018

Responsables del Informe



Centre de Recerca i  
Innovació en Toxicologia  
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Carmen Riva  
Dirección del CRIT

Fdo. Dra. Bettina Vallès  
Dirección Técnica



# ANEXOS



## **INDICE:**

1. Resumen
2. Objetivo del Estudio
3. Sustancia / Producto de Ensayo
4. Organismo de Ensayo
5. Condiciones de ensayo
6. Desarrollo del ensayo
7. Resultados
8. Conclusión
9. Validación
10. Referencias



## 1.-Resumen

Se ha realizado el Estudio de la toxicidad aguda en dafnias de la muestra referenciada:

### **ECOFIRE.**

Para la determinación de la inhibición de la movilidad se ha utilizado la especie de crustáceos *Daphnia magna* y se ha seguido el método operativo MO 03 basado en el método OCDE 202 (2004).

El crustáceo de agua dulce *Daphnia magna* ha sido sometido a la muestra **ECOFIRE** a las concentraciones de ensayo: 0,1, 0,22, 0,48, 1, 2,2, 4,8 y 10% (1,13, 2,49, 5,42, 11,3, 24,9, 54,2 y 113 g/L) de dicha muestra. La duración total del ensayo ha sido 48 horas.

El resultado obtenido en este ensayo nos indica que la muestra **ECOFIRE** presenta un valor de CE<sub>50</sub> (24h) igual a 13,8 g/L (13.800 mg/L) y un valor de CE<sub>50</sub> (48h) igual a 6,0 g/L (6.000 mg/L) para la especie *Daphnia magna*.

## 2.-Objetivo del Estudio

El objetivo del estudio es investigar los efectos de la sustancia o producto de ensayo en el crustáceo de agua dulce *Daphnia magna* durante 48 horas de exposición.

## 3.-Sustancia de ensayo

**Muestra con referencia:** ECOFIRE



#### 4.-Organismo de ensayo

- Cepa: *Daphnia magna*, Strauss (Cladocera, Crustacea)
- Edad: ≤ 24-horas de vida y en buenas condiciones fisiológicas
- Procedencia: Universidad de Stirling de Reino Unido
- Condiciones de cultivo. El cultivo de dafnias a partir del cual se han obtenido los individuos para llevar a cabo el ensayo presenta las siguientes condiciones:
  - Temperatura: entre 18 y 22 °C
  - Fotoperiodo de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad
  - Sin aeración
  - Alimentación:
    - Tipo de alimento: *Chlorella* (microalga de agua dulce) y extracto de algas marinas
    - Frecuencia de administración de alimento: 3 veces/semana

#### 5.-Condiciones de ensayo:

- Duración del ensayo: 48 horas
- Temperatura de ensayo: 20 ± 2 °C
- Fotoperiodo: oscuridad
- Descripción del diseño de ensayo:
  - Recipientes de ensayo: Tubos de ensayo (40 mL) tapados con parafilm.
  - Volumen de ensayo utilizado: 10 mL
- Nº de recipientes de ensayo por concentración: 4
- Nº de individuos por concentración: 20, repartidos en 5 individuos por recipiente de ensayo
- Edad de los individuos: menos de 24 horas de vida



➤ Composición Medio de cultivo (agua de dilución):

Composición del medio de cultivo ASTM E 729-96:

— Solución 1: CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2,4 g/L H <sub>2</sub> O
— Solución 2: MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	49,1 g/L H <sub>2</sub> O
— Solución 3: NaHCO <sub>3</sub>	38,4 g/L H <sub>2</sub> O
— Solución 4: KCl	1,6 g/L H <sub>2</sub> O

Añadir a 1000 mL de agua desionizada:

solución 1	50 mL
solución 2	5 mL
solución 3	5 mL
solución 4	5 mL

## 6.-Desarrollo del Ensayo

- Concentraciones de ensayo: 0,1%, 0,22%, 0,48%, 1%, 2,2%, 4,8% y 10%, más un control (únicamente medio de cultivo)
- Número de concentraciones de ensayo: 7 + control
- Factor de progresión geométrica utilizado: 2,2
- Preparación de las soluciones madre y de ensayo: Se ha preparado una solución madre con una concentración de 10% (100 mL/L) del material presentado (ref: **ECOFIRE** ). Por lo tanto, 10 mL del material presentado se ha disuelto en 100 mL de medio de cultivo en un frasco volumétrico, Clase A de 100 mL mediante agitación, por lo que tenemos una solución madre de 1000 mg/L. Las diferentes soluciones utilizadas en el ensayo han sido preparadas a partir de esta solución madre de 1000 mg/L de producto de ensayo.
- Las disoluciones utilizadas en el ensayo han sido preparadas a partir de esta solución madre, para obtener las concentraciones de ensayo.
- Para poder pasar las concentraciones expresadas en porcentaje (%) en peso (g/L), se han pesado 100 mL del material presentado (113 g). A partir de esta relación se ha deducido las concentraciones:



%	mL/L	g/L
0,1	1	1,13
0,22	2,2	2,48
0,48	4,8	5,42
1	10	11,3
2,2	22	24,9
4,8	48	54,2
10	100	113

- Condiciones de ensayo: Los recipientes de ensayo se colocan en un armario incubador isotérmico a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  y oscuridad durante un período de exposición de 48 h.

## 7.-Resultados

- Valores de pH:
  - Valor pH medio de cultivo al inicio del ensayo: 7,57
  - Valor pH medio de cultivo al final del ensayo: 7,42
  - Valor pH concentración mínima al inicio del ensayo: 7,60
  - Valor pH concentración mínima al final del ensayo: 7,39
  - Valor pH concentración máxima al inicio del ensayo: 7,31
  - Valor pH concentración máxima al final del ensayo: 7,09
  
- Valores de concentración de O<sub>2</sub> disuelto (mg/L):
  - Valor O<sub>2</sub> disuelto medio de cultivo al inicio del ensayo: 8,24
  - Valor O<sub>2</sub> disuelto medio de cultivo al final del ensayo: 8,12
  - Valor O<sub>2</sub> disuelto concentración mínima al inicio del ensayo: 8,28
  - Valor O<sub>2</sub> disuelto concentración mínima al final del ensayo: 8,10
  - Valor O<sub>2</sub> disuelto concentración máxima al inicio del ensayo: 8,23
  - Valor O<sub>2</sub> disuelto concentración máxima al final del ensayo: 8,17



7527/254.18b

Los resultados de número de individuos móviles a las 24 y 48 horas están representados en las siguientes tablas.

**Tabla 1: Número de individuos móviles a las 24 horas**

Concentración (%)	Nº individuos móviles				
	replicas				Total
	1	2	3	4	
<b>Control</b>	5	5	5	5	20
<b>0,1</b>	5	5	5	5	20
<b>0,22</b>	5	5	5	5	20
<b>0,48</b>	4	4	5	5	18
<b>1</b>	3	3	3	3	12
<b>2,2</b>	1	2	1	1	5
<b>4,8</b>	0	0	0	0	0
<b>10</b>	0	0	0	0	0

**Tabla 2: Número de individuos móviles a las 48 horas**

Concentración (%)	Nº individuos móviles				
	replicas				Total
	1	2	3	4	
<b>Control</b>	5	5	5	5	20
<b>0,1</b>	5	5	5	5	20
<b>0,22</b>	4	4	4	4	16
<b>0,48</b>	2	3	3	3	11
<b>1</b>	1	2	2	1	6
<b>2,2</b>	0	0	0	0	0
<b>4,8</b>	0	0	0	0	0
<b>10</b>	0	0	0	0	0



En la siguiente tabla, se representa el porcentaje de inhibición de la movilidad de las dafnias a las 24 y 48 horas de ensayo.

**Tabla 3: % Inhibición de la movilidad**

Conc.		% inhibición movilidad (24h)	% inhibición movilidad (48h)
%	g/L		
<b>Control</b>		<b>0</b>	<b>0</b>
<b>0,1</b>	<b>1,13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>0,22</b>	<b>2,49</b>	<b>0</b>	<b>20</b>
<b>0,48</b>	<b>5,42</b>	<b>10</b>	<b>45</b>
<b>1</b>	<b>11,3</b>	<b>40</b>	<b>70</b>
<b>2,2</b>	<b>24,9</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
<b>4,8</b>	<b>54,2</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>113</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

## Resultados

La Concentración de **ECOFIRE** que produce una inhibición de la movilidad del 50% en *Daphnia magna* después de 24 y 48 horas de exposición ( $CE_{50}$  24h y  $CE_{50}$  48h), ha sido determinada mediante el método Probit con unos límites de confianza del 95%, obteniendo el siguiente resultado:

$$CE_{50} (24h) = 1,2 \% (0,96 - 1,6)$$

$$CE_{50} (24h) = 13,8 \text{ g/L } (10,8 - 17,8)$$

$$CE_{50} (48h) = 0,53 \% (0,40 - 0,70)$$

$$CE_{50} (48h) = 6,0 \text{ g/L } (4,6 - 7,9)$$



## **8.-Conclusión**

El resultado obtenido en este ensayo nos indica que la muestra **ECOFIRE** presenta un valor de  $CE_{50}$  24h igual a 13,8 g/L (13.800 mg/L) y un valor de  $CE_{50}$  48h igual a 6,0 g/L (6.000 mg/L) en la especie *Daphnia magna*. Este producto no presenta toxicidad por debajo de la concentración 1,13 g/L (1.130 mg/L).

## **9.-Validación**

El criterio de validación considerado para este ensayo es:

- el porcentaje de inmovilización observado en los recipientes control es inferior o igual al 10%
- la  $CE_{50}$ -24h del dicromato de potasio está comprendida entre 0,6 mg/L y 1,7mg/L.

## **10.-Referencias**

1. OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 (2004): “*Daphnia sp*, Acute Immobilisation Test”
2. MO 03 v.06 (2010) “Ensayo de Toxicidad aguda en dafnias”
3. MO 03-1 v.05 (2011) “Mantenimiento de cultivos de dafnias”
4. MO 03-2 v.02 (2009) “Preparación de medio de cultivo para dafnias”
5. MO 03-3 v.04 (2010) “Preparación de alimento para dafnias”