



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS MATEMÁTICAS, FÍSICAS Y QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO DE TITULACIÓN

MODALIDAD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO

“ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO ECOTOXICOLÓGICO PARA LA
EVALUACIÓN QUÍMICO-AMBIENTAL DE AGUA DULCE MEDIANTE LA
DETERMINACIÓN DE LA CL_{50} DE DICROMATO DE POTASIO EN PEZ GUPPY
(POECILIA RETICULATA). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, 2015”

AUTORA

GABRIELA ELIZABETH FUENTES MASTARRENO

TUTOR

ING. ULBIO ALCÍVAR CEDEÑO, MG.

PORTOVIEJO, 2015

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo investigativo a todas y cada una de las personas que estuvieron involucradas.

En primera instancia a Dios creador de todo lo que nos rodea y que en seguimiento de su doctrina me ha permitido con responsabilidad y fe cumplir con éxito el objetivo planteado.

A mis abuelitos Judith y Carlos que desde el cielo me iluminan y me guían por el camino del bien.

A mis padres Walter y Dalinda, y a mi hermano Xavier por ese apoyo único e incondicional que me han brindado en todas mis etapas de estudios y por todo el amor que me brindan día a día, además de ser una motivación para seguir creciendo día a día como una gran profesional.

A mi esposo que de una u otra manera ha estado junto a mí en las buenas y en las malas para brindarme todo su apoyo.

Y sin duda alguna dedicarle todo este esfuerzo a mi hija Emily ya que ella es el pilar fundamental de mi vida la cual me inspira valentía y ganas de seguir adelante.

A Cecilia Loor ya que ha sido siempre como una madre para mí la cual me ha llenado de muchos consejos y palabras que me motivaron a continuar hasta el final.

Además quisiera dedicarle este trabajo a mi director de tesis, el mismo que con ayuda de su orientación de docente me guio paso a paso en la estructuración de la misma, derrochando calidad humana y comprensión en cada una de sus tutorías.

Gabriela Fuentes Mastarreno

Agradecimiento

El agradecimiento es un don Divino que nos hace apegarnos a Dios. Por eso agradezco a mi Dios por darme vida y alegría de compartir con los míos.

Quisiera agradecer a la facultad de ciencias matemáticas, físicas y químicas, institución a la cual le debo mi formación como profesional.

A los docentes por su orientación y su forma de llegar al estudiante para impartir sus conocimientos al alumnado.

A nuestro director de tesis Ing. Ulbio Alcívar, al tribunal de evaluación y revisión.

A todas las personas que de una y otra manera intervinieron directa e indirectamente en esta tesis, por contribuir y colaborar en la preparación de mí trabajo.

La Autora

Certificación del Tutor de Trabajo de Titulación

Yo, Ingeniero Ulbio Alcívar Cedeño, catedrático de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí, para los fines legales:

CERTIFICO

Que este Trabajo de Titulación titulado “ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO ECOTOXICOLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN QUÍMICO - AMBIENTAL DE AGUA DULCE MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀ DE DICROMATO DE POTASIO EN PEZ GUPPY (*POECILIA RETICULATA*). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, 2015”, ha sido dirigido, asesorado supervisado y realizado bajo mi dirección en todo su desarrollo, y dejo constancia de que es original de la autora: FUENTES MASTARRENO GABRIELA ELIZABETH.

Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del jurado examinador.

Ing. Ulbio Alcívar Cedeño, Mg.
TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certificación del Revisor de trabajo de titulación

Luego de haber revisado el Trabajo de Titulación, en la modalidad de Investigación y que lleva por tema “ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO ECOTOXICOLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN QUÍMICO-AMBIENTAL DE AGUA DULCE MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀ DE DICROMATO DE POTASIO EN PEZ GUPPY (*POECILIA RETICULATA*). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, 2015” desarrollada por la egresada Fuentes Mastarreno Gabriela Elizabeth CC. 131254265-5, previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico, bajo la tutoría y control del Ing. Ulbio Alcívar Cedeño y cumpliendo con todos los requisitos del nuevo REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, aprobada por el Honorable Consejo Universitario, el 09 de junio del 2015, cumpla con informar que en la ejecución del mencionado Trabajo de Titulación, la autora:

- 1.) ha respetado los derechos de autor correspondiente al tener menos del 10% de similitud con otros documentos existentes en el repositorio,
- 2.) ha aplicado correctamente el manual de etilos de la Universidad Andina Simón Bolívar del Ecuador,
- 3.) las conclusiones guardan estrecha relación con los objetivos planteados,
- 4.) el trabajo posee suficiente argumentación técnico – científica, evidenciada en el contenido bibliográfico consultado, y
- 5.) mantiene rigor científico en las diferentes etapas de su desarrollo.

Sin más que informar suscribo este documento no vinculante para los fines legales pertinentes.

Ing. Iván Cisneros Pérez
REVISOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certificación del Tribunal de Revisión y Evaluación

Nosotros los miembros del Tribunal de Revisión y Evaluación indicamos y certificamos que el trabajo de titulación Titulado “ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO ECOTOXICOLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN QUÍMICO - AMBIENTAL DE AGUA DULCE MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀ DE DICROMATO DE POTASIO EN PEZ GUPPY (*POECILIA RETICULATA*). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, 2015”, se realizó con el cumplimiento de todos los requisitos estipulados por el Reglamento General de Graduación de la Universidad Técnica de Manabí.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Declaración de Autoría

Yo, FUENTES MASTARRENO GABRIELA ELIZABETH, egresada de la Escuela de Ingeniería Química perteneciente a la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí, declaro que el presente trabajo de investigación Titulado “ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO ECOTOXICOLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN QUÍMICO - AMBIENTAL DE AGUA DULCE MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CL_{50} DE DICROMATO DE POTASIO EN PEZ GUPPY (*POECILIA RETICULATA*). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, 2015”, es de mi propia autoría y como tal será protegido por las leyes establecidas en el Estado Ecuatoriano de derecho tal como se establece en los Artículos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de la Ley de Propiedad Intelectual, por lo tanto la falta de los permisos correspondientes o su mal uso será penalizado por la ley; así mismo se asume todas las consideraciones y responsabilidades que correspondan al mismo.

Portoviejo, Septiembre del 2015

Gabriela Elizabeth Fuentes Mastarreno
EGRESADA DE LA ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Índice de contenido

Portada	I
Dedicatoria	II
Agradecimiento	III
Certificación del Tutor de Trabajo de Titulación.....	IV
Certificación del Revisor de trabajo de titulación.....	V
Certificación del Tribunal de Revisión y Evaluación	VI
Declaración de Autoría.....	VII
Índice de contenido.....	VIII
Resumen	XII
Summary.....	XIII
1. Tema.....	1
2. Planteamiento del Problema.....	2
2.1. Introducción	2
2.2. Identificación del problema.....	3
2.3. Formulación del problema	3
2.4. Delimitación del problema.....	4
3. Revisión de la Literatura y Desarrollo del Marco Teórico	5
3.1. Antecedentes	5
3.2. Justificación.....	6
3.3. Marco teórico	7
3.3.1. Generalidades medioambientales	7

Clasificación de los ecosistemas de agua dulce	8
3.3.2. Ecotoxicología y toxicología ambiental	9
3.3.3. Toxicidad ambiental y agentes tóxicos.....	10
3.3.4. Pruebas de toxicidad.....	11
3.3.5. Infraestructura en el laboratorio de toxicología.....	16
3.3.6. Tóxicos de referencia	17
3.3.7. Selección de organismos para pruebas	21
3.3.8. Preparación del material	25
3.3.9. Expresión de los resultados	25
3.3.10. Aseguramiento y control de calidad de los ensayos de toxicidad .	25
3.3.11. Protocolos de prueba	27
3.3.12. Objetivos finales de las pruebas de toxicidad.....	27
3.3.13. Descargas de aguas residuales industriales en la franja costera	27
4. Visualización del Alcance del Estudio.....	29
5. Elaboración de Hipótesis y Definición de Variables	30
5.1. Hipótesis.....	30
5.2. Variables y su Operacionalización.....	30
5.2.1. Variables.....	30
5.2.2. Operacionalización de las variables	31
6. Diseño de Investigación	33
6.1. Objetivos	33
6.1.1. Objetivo general	33
6.1.2. Objetivos específicos.....	33
6.2. Tipo de investigación	33
6.3. Métodos.....	34
6.4. Diseño experimental.....	34

7.	Definición y Selección de la Muestra	35
7.1.	Ensayo	35
7.1.1.	Procedimiento de esterilización.....	35
7.1.2.	Preparación de agua de dilución y medios de cultivo	35
7.1.3.	Preparación de la serie de dilución de la sustancia tóxica.....	36
7.1.4.	Pruebas de toxicidad.....	39
7.2.	Metodología de los análisis estadísticos	41
7.2.1.	Método Probit.....	41
7.2.2.	Método de estimación gráfica	42
7.2.3.	Análisis de la varianza Anova con Statgraphics.....	43
7.3.	Recursos utilizados.....	44
7.3.1.	Recursos humanos	44
7.3.2.	Recursos operativos.....	44
8.	Recolección de los Datos	46
8.1.	Ecotoxicología, descripción del pez guppy y dicromato de potasio	46
8.2.	Parámetros y procedimientos para la evaluación ecotoxicológica.....	47
8.2.1.	Soluciones.....	47
8.2.2.	Dosis	48
8.2.3.	Experimento	49
8.3.	Exposición del pez guppy a diferentes concentraciones de dicromato de potasio para estandarizar su CL_{50}	49
9.	Análisis de los Datos	56
9.1.	Evaluación estadística por el método Probit	56
9.2.	Verificación de los resultados	57
9.2.1.	Concentración letal 50 (CL_{50})	60
9.2.2.	Evaluación estadística de la regresión.....	61

9.2.3. Análisis de la varianza.....	62
9.3. Equipos, materiales y reactivos.....	63
9.3.1. Materiales	63
9.3.2. Equipos	64
9.3.3. Sustancias y reactivos.....	64
10. Elaboración del Reporte de los Resultados.....	65
10.1. Discusión	65
10.2. Conclusiones.....	68
10.3. Recomendaciones	69
Presupuesto.....	70
Tema	70
Entidad.....	70
Postulante.....	70
Cronograma	71
Referencias Bibliográficas	72
Anexos	76

Resumen

Durante varios años, en diferentes países del mundo, se han realizado procedimientos estandarizados para la evaluación ecotoxicológica de sustancias químicas que contaminan el medio ambiente, para lo cual se desarrollan una serie de bioensayos que determinan los efectos tóxicos de aquellas sustancias en los organismos y en los ecosistemas, favoreciendo la protección ambiental; pero, en nuestro país y particularmente en nuestra provincia, han sido poco desarrollados y tomados en cuenta. Dada la anterior explicación, se realizó el presente trabajo de tipo descriptivo y correlacional con diseño experimental mediante ensayos ecotoxicológicos *in situ* de toxicidad aguda, desarrollado en el Laboratorio de ecotoxicología de Escuela de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí, de la ciudad de Portoviejo, durante el periodo de Marzo de 2015 hasta Agosto de 2015; con una población de 150 organismos de la especie pez guppy (*Poecilia reticulata*) de menos de 24 horas de nacidos. El objetivo principal fue estandarizar el protocolo para la evaluación ecotoxicológica de agua dulce mediante la determinación de la CL_{50} de dicromato de potasio en el pez guppy. Los resultados de la investigación determinaron que todos los grupos de organismos expuestos a diferentes concentraciones preparadas con dicromato de potasio presentaron mortalidad a partir del 10%, a excepción del grupo control en agua dulce; siendo el grupo de 1,0 ppm el que presentó el mayor porcentaje de mortalidad con el 50%; además los grupos de 0,25 y 0,50 ppm, evidenciaron un resultado igual de mortalidad, es decir del 40%; la dosis-respuesta fue del 100% de letalidad a una concentración de solución de 1,0 ppm de dicromato de potasio. Con este trabajo se logró estandarizar un protocolo ecotoxicológico para la evaluación químico-ambiental de agua dulce mediante la determinación de la CL_{50} de dicromato de potasio en el pez guppy que servirá para futuras investigaciones de importancia científico-académica.

PALABRAS CLAVE: Ecotoxicología; Estandarización; Bioensayo; CL_{50} ; Dicromato de potasio; Pez guppy (*Poecilia reticulata*).

Summary

For several years, in different countries of the world, standardized procedures for the Ecotoxicological evaluation of chemicals that pollute the environment, have been made to develop a series of bioassays that determine the toxic effects of substances in organisms and ecosystems, favouring environmental protection; but, in our country, and particularly in our province, they have been little developed and taken into account. Given the previous explanation, was carried out this work of descriptive and correlational type with experimental design through trials ecotoxicological on-site acute toxicity, developed in the laboratory of ecotoxicology of school of chemical engineering of the Faculty of mathematical sciences, physical and chemical of the University technique of Manabi, in the city of Portoviejo, during the period of March 2015 to August 2015; with a population of 150 bodies of guppy fish species (*Poecilia reticulata*) born less than 24 hours. The main objective was to standardize the Protocol for the Ecotoxicological evaluation of freshwater through the determination of the LC₅₀ for the guppy fish potassium dichromate. The results of the research determined that all groups of organisms exposed to various concentrations prepared with potassium dichromate had mortality from 10%, with the exception of the group control in fresh water; being the Group of 1.0 ppm, which presented the highest percentage mortality with 50%; In addition the 0.25 and 0.50 ppm groups, showed a result equal mortality, i.e. 40%; the dose-response was 100% fatality at a concentration of 1.0 ppm of potassium dichromate solution. This work is managed to standardize a protocol ecotoxicological quimico-ambiental assessment of freshwater through the determination of LC₅₀ of potassium dichromate in the fish guppy which will serve for future investigations of scientific-academic importance.

KEY WORDS: Ecotoxicology; Standardization; Bioassay; LC₅₀; Potassium dichromate; Fish guppy (*Poecilia reticulata*).

1. Tema

ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO ECOTOXICOLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN QUÍMICO-AMBIENTAL DE AGUA DULCE MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CL50 DE DICROMATO DE POTASIO EN PEZ GUPPY (POECILIA RETICULATA). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, 2015.

2. Planteamiento del Problema

2.1. Introducción

Los peces suelen ser muy sensibles a la contaminación, por lo cual están desapareciendo del agua cercana a zonas urbanas, donde anteriormente habitaban mayormente. Por esta razón algunas entidades de investigación desarrollan estandarizaciones protocolizadas para ejecutar ensayos biológicos, sea de toxicidad aguda o crónica, dada la importancia ecológica que presentan un gran número de esta especie, además de ser una especie muy vulnerable. (Silva, y otros 2007, 39)

El dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$, es un reactivo químico inorgánico común, que habitualmente se utiliza como un agente oxidante en diversas aplicaciones de laboratorio y la industria. Al igual que con todos los compuestos de cromo hexavalente, puede provocar toxicidad aguda y crónica que es perjudicial para la salud y debe manipularse y eliminarse de manera apropiada. (Docsetools 2015)

Entre los principales síntomas y efectos del dicromato de potasio están la irritación y corrosión, las reacciones alérgicas, tos e insuficiencia respiratoria. Los cromatos y dicromatos, como enérgicos oxidantes, pueden producir quemaduras y oxidaciones sobre la piel y las mucosas así como irritaciones en las vías respiratorias superiores. (Merck 2014)

El objetivo de esta investigación es el determinar los efectos de la toxicidad aguda en peces guppy del dicromato de potasio. Para describir la toxicidad del dicromato en el organismo del pez guppy en los organismos se incluirá datos de la concentración letal media (CL_{50}).

El Estudio se realizó en la Universidad Técnica de Manabí de la ciudad de Portoviejo, provincia de Manabí – Ecuador, en el área de Laboratorio de Ecotoxicología durante los meses de Marzo de 2015 hasta Agosto de 2015.

2.2. Identificación del problema

Las evidencias de que el desarrollo industrial, el crecimiento de la población y la sobre-explotación de los recursos naturales han conducido a una severa degradación ambiental, son tan evidentes que se ha generado una gran preocupación a nivel nacional e internacional por la conservación del ambiente, de manera que el desarrollo humano sea viable. (Gold-Bouchot y Zapata-Pérez 2004, 278)

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), menos del 10% de los municipios de Latinoamérica trata los desechos en forma adecuada antes de descargarlos en los cursos de agua naturales, y las plantas de tratamiento de aguas residuales y efluentes industriales frecuentemente están fuera de servicio o directamente no existen. (Herkovits y Pérez-Coll 2006, 17)

En la práctica de actividades industriales, de desarrollo, investigativas y de educación, se producen residuos químicos de alta peligrosidad que necesitan una debida manipulación y medidas que favorezcan un manejo con criterio y respetando al medio ambiente. (Vaca Álvarez 2012, 1)

En el Ecuador y específicamente en la provincia de Manabí, se cuenta con muy pocos datos sobre el nivel de toxicidad aguda que produce en el organismo humano o animal, y en este caso del pez guppy, el uso de dicromato de potasio, para establecer parámetros que determinen su manejo adecuado y prevenir riesgos en la salud y determinar sus efectos.

Es de gran interés para la Universidad Técnica de Manabí, y en especial para la Carrera de Ingeniería Química estandarizar un protocolo que evalúe la ecotoxicidad del pez guppy mediante la determinación de la CL50 de dicromato de potasio, en nuestro medio.

2.3. Formulación del problema

De acuerdo a lo expuesto, nos planteamos la siguiente interrogante:

¿Se puede establecer un protocolo para la evaluación ecotoxicológica en agua dulce mediante la determinación de la CL50 de dicromato de potasio en el pez guppy (*Poecilia reticulata*), en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Técnica de Manabí?

¿Cuáles son los parámetros y procedimientos necesarios para la evaluación ecotoxicológica de agua dulce, mediante ensayos de CL50 en el pez guppy (*Poecilia reticulata*) con dicromato de potasio como sustancia patrón?

¿Cómo se logrará exponer al pez guppy a diferentes concentraciones de dicromato de potasio para estandarizar su CL50, en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Técnica de Manabí?

¿Qué métodos se emplearán para identificar y tabular los resultados obtenidos mediante la relación dosis – respuesta, para determinar su CL50?

¿Qué equipos, accesorios y reactivos necesarios se utilizarán para la estandarización del protocolo de evaluación ecotoxicológica de agua dulce mediante ensayos en pez guppy?

2.4. Delimitación del problema

Este trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Escuela de Ingeniería Química perteneciente a la Universidad Técnica de Manabí. En el cual se abarcó el análisis de pez guppy (*Poecilia reticulata*) como especie de estudio y su exposición a una sustancia tóxica la cual se escogió como referencia al dicromato de potasio, determinando su CL50 para medir su ecotoxicidad y el porcentaje de mortalidad, identificando sus características, efectos letales o subletales y los resultados más relevantes, lo cual se realizó bajo procedimientos estándares definidos en la literatura.

El laboratorio de Ecotoxicología, consta de mesones recubiertos con pintura epóxica, instalación de agua potable y agua residual, instalaciones eléctricas con puntos de luz de 110 V y 220 V, aire acondicionado, botiquín de primeros auxilios con sus respectivos materiales, EPP, extintor, modulares de aluminio - vidrio, complementando el espacio físico con lámparas y pizarra líquida, bajo las condiciones de la Escuela de Ingeniería Química.

El presente trabajo de investigación proyecto se realizó durante el período de Marzo del 2015 hasta Agosto del 2015.

3. Revisión de la Literatura y Desarrollo del Marco Teórico

3.1. Antecedentes

La finalidad de la ecotoxicología, es aportar datos sobre la peligrosidad que constituye la presencia de compuestos tóxicos sean naturales o antropogénicos en el medio ambiente. (Capó Martí 2007, 15)

En el Ecuador, la contaminación es un problema que aumenta en su pese a que las autoridades, las organizaciones sociales y la población en general realizan esfuerzos para contrarrestar los efectos de este proceso destructivo. Existen aproximadamente cuatro mil industrias, en especial en las ciudades de Quito, Guayaquil, Cuenca, Ambato y Riobamba, las cuales se estima son las que producen mayormente los residuos contaminantes con sustancias químicas dañinas como desecho de su producción; y estos contaminantes químicos van a parar a las aguas residuales. (La Hora 2007)

En estudios realizados en los que se ha analizado el agua y al suelo en diferentes sectores, muestran existen residuos de cromo, níquel y plomo, los cuales son sustancias usadas por las industrias que desechan estos elementos sin las debidas precauciones. Según estudios realizados, el cromo es un metal pesado muy tóxico que produce lesiones cutáneas y que a largo plazo puede provocar cáncer. (La Hora 2007)

En la provincia de Manabí, la contaminación por parte de las empresas es uno de los problemas que no han sido controlados por los gobiernos locales, por la falta de personalidad al administrar los debidos controles y sanciones del caso. (La Hora 2007)

La razón primordial de utilizar a los peces como organismo de prueba tiene que ver con su función y ubicación en la escala acuática, debido a que se sitúan en distintas posiciones dentro de los ecosistemas, y por ser especies acuáticas, se consideran dignos representantes de los organismos más desarrollados, por lo cual los efectos tóxicos que se pueden observar en ellos son más simples para analizar y estudiar, y además muchos tipos de peces pertenecen a pesquerías de importancia comercial o son cultivados para producir alimentos o como especies ornamentales. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 117)

“La evaluación biológica de los efectos tóxicos que producen los contaminantes químicos sobre los organismos acuáticos es fundamental para establecer medidas de

control que restrinjan o limiten la contaminación en los ecosistemas acuáticos receptores de descargas” (Martínez-Jerónimo, Rodríguez-Estrada y Martínez-Jerónimo 2008, 153).

3.2. Justificación

El cromo es un compuesto muy tóxico que puede ser difundido enormemente en el medio ambiente y actuar contaminando al ser desechado por diferentes tipos de industrias. Esta sustancia con el tiempo puede ser acumulado en el entorno animal y vegetal ingresando al organismo de los seres humanos provocando varias patologías nocivas para el hombre. El Cr (III) y Cr (VI) son los estados de oxidación más frecuentes de dicho metal, especialmente como aniones de cromato, cromato ácido o dicromato, los cuales tienen características químicas y biológicas distintas. (Rozas Riquelme 2008, 2)

“Las fuentes habituales de aguas residuales que contienen grandes cantidades de metales como el cromo, cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc proceden, principalmente, de limpieza de metales, recubrimientos, curados, refinado de fosfato y bauxita, generación de cloro, fabricación de baterías y teñidos” (Alcívar Bazurto y León Macías 2011, 27).

“Los efectos que provocan sobre el medio ambiente son los siguientes: mortalidad de los peces, envenenamiento de ganado, mortalidad de plancton, acumulaciones en el sedimento de peces y moluscos” (Alcívar Bazurto y León Macías 2011, 27).

Esta investigación fue factible ya que se contó con el interés, motivación, tiempo y con los medios adecuados tanto técnicos como científicos, ya que el estudio se desarrolló en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas; se cuenta con la facilidad para acceder a las fuentes de información requeridas. Además la especie escogida como población para la investigación, es de fácil acceso y es muy común.

3.3. Marco teórico

3.3.1. Generalidades medioambientales

El medio ambiente es el entorno de todos los seres vivos del planeta junto con el aire, el agua y el suelo, siendo el sitio donde se desarrolla su ciclo vital, el cual procura mantener un equilibrio ecológico. La Tierra ha brindado muchos recursos a la humanidad para mantener la vida, pero cuando comenzó el aumento de concentración en la población con una actividad importante, empezaron a manifestarse los diferentes tipos de contaminación provocados por las aglomeraciones urbanas, entre ellos la contaminación del agua. (Capó Martí 2007, 9)

Los servicios que brinda el ecosistema engloban la participación de los organismos vivientes en la fabricación de alimentos, el purificado y el reciclaje de compuestos, protección, y producción de recursos naturales, los cuales son necesarios para el mantenimiento de la vida y especialmente necesarios para el ser humano. (Herkovits y Pérez-Coll 2006, 15)

La polución es un problema que siempre ha existido en el ambiente, en siglos pasados era causado por los fenómenos propios de la naturaleza, que podían manifestarse como las tormentas de arena, o las erupciones de los volcanes, entre otras; pero desde hace varios años este problema es provocado por la raza humana, cuyas actividades influyen enormemente sobre la naturaleza creando contaminación. (Capó Martí 2007, 11)

Barros Santiago y Gámez Rojas (2008) sintetizan que los ecosistemas acuáticos son un punto en el que interactúan muchos factores biológicos y no biológicos, los cuales podrían modificarse rápidamente. Estos ecosistemas incluyen las aguas de los océanos que son los ecosistemas marinos; las aguas continentales dulces como los ríos, lagos, pantanos y demás fuentes acuáticas; y por último las aguas saladas. (4)

“Acerca del agua dulce de los ríos, es preciso tener en cuenta que presenta una enorme variedad de composición. Como esta composición química depende, en primer lugar, de lo que el agua pueda disolver del suelo por el que discurre, o de los lugares a donde se dirige, es el suelo lo que determina la composición química del agua” (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 4).

El agua es mucho más densa que el aire, por lo cual las dificultades estructurales de mantener un organismo grande en su hábitat son pocas. Esta es, tal vez, la característica más importante del agua que ha dejado evolucionar un estilo de vida como el plancton que no tiene ningún análogo en el aire. Sin embargo, el agua puede tener limitaciones sobre sus habitantes lo que no ocurre en ecosistemas terrestres. Debido a la alta densidad y viscosidad que tiene el agua, es más complicado el movimiento para los organismos, ya que debe intentar viajar rápidamente o mover las grandes cantidades del agua sobre sus agallas. (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 5)

Clasificación de los ecosistemas de agua dulce

En relación con el movimiento del agua, se emplea una división de los ecosistemas de agua dulce. Esta división es importante tanto para estudiar la naturaleza como para la explotación y gestión de las aguas interiores. Los tipos de ecosistemas de agua dulce son: lenticos (lago, estanque, pantano, charcas), aguas corrientes o loticos (manantial, riachuelo (arroyo), río) y humedales:

- Ecosistema léntico: es de agua quieta o de poco caudal como en los lagos, estanques, pantanos y embalses.
- Ecosistema lótico (latín *lotus*: participio de *lavere*, lavar): sistema de agua corriente como en los ríos, arroyos y manantiales.
- Ecosistema de humedal: áreas donde el suelo está saturado de agua o inundado durante épocas del año. (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 6)

Contaminación de los ecosistemas acuáticos

El aumento de la población a nivel mundial ha favorecido el incremento de los niveles de contaminación. Esta contaminación se relaciona con el vertido de agua de desecho de origen doméstico e industrial a los cuerpos de agua, incorporación de microorganismos y productos químicos. Estos materiales de desecho afectan al agua en cuanto su calidad y por ende la convierten en inservible para los diferentes usos. Como alternativa a estos problemas, se ha propuesto el uso de indicadores microbianos que se identifican mediante la utilización de métodos fáciles, rápidos y económicos. (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 12)

La calidad del agua se determina mediante los análisis fisicoquímicos y bacteriológicos. En la actualidad, en los países más avanzados, se han están implementando sistemas de evaluación de la calidad del agua basados en la

investigación biológica de los macroinvertebrados en el agua, los cuales han demostrado ser útiles para establecer los niveles de contaminación de las fuentes acuáticas y planificar así, estrategias para la recuperación de las ellas. (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 13)

3.3.2. Ecotoxicología y toxicología ambiental

La toxicología ambiental se encarga de la investigación de la dosis sin efecto y aparentemente, es mejor dicho, una ciencia de seguridad, por lo que se ha promovido para ella términos como Impunología, Akeraiología o Asfaletología, que no han sido aceptados mayoritariamente y cuya definición es sin peligro, o con seguridad. (Capó Martí 2007, 11)

La ecotoxicología podría definirse como la ciencia que estudia el origen y los efectos de la polución en los seres vivos y su entorno, además de las moléculas que la constituyen, como desencadenantes de criterios y profilaxis social y económica. (Capó Martí 2007, 12)

La Ecotoxicología es el estudio fundamental de los sistemas bióticos en forma de toxicidad, alteración de especies, reducción de su productividad, porque un polutante no siempre se manifiesta como un tóxico neto, sino que podría incentivar solamente la iniciación de un nivel no deseable en un determinado ecosistema. (Capó Martí 2007, 12)

Pensando en un polutante como un agente físico o elemento químico que está presente en el medio ambiente y que puede causar la muerte por envenenamiento en los organismos vivos, entonces, el contaminante sería la sustancia que por lo comunes el resultado de la actividad humana sin que necesariamente produzca efectos biológicos, mientras que se define como polutante a la sustancia química que encierra ambas situaciones, lo que significa que se presenta como el resultado de la actividad humana siendo también nociva. (Capó Martí 2007, 12)

Capó Martí (2007) refiere que en la ecotoxicología, para tener algún significado tanto los agentes físicos como los compuestos químicos se investigan mayormente por el peligro que representan, que por la toxicidad relativa que producen, siendo aplicados a ciertas condiciones de exposición. (12)

3.3.3. Toxicidad ambiental y agentes tóxicos

Toxicidad ambiental y contaminación

A lo largo del tiempo, las actividades antropogénicas han creado distintos tipos de contaminantes, los cuales han provocado el deterioro de los diferentes compartimentos ambientales, afectando al agua, al aire, al suelo y al sedimento, además de la biota asociada y por lo tanto a los ecosistemas. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 5)

Estos efectos dependen de la concentración en las que tienen las sustancias, la persistencia y su biodisponibilidad, lo que podría producir efectos no letales, y asimismo el desplazamiento temporal de ciertas especies, llegando tal vez, a la desaparición de grandes poblaciones. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 5)

Ramírez Romero y Mendoza Cantú (2008) distinguen que los efectos de la contaminación comenzaron a ser mayormente demostrativas desde la Revolución Industrial entre los años 1830 a 1890, cuando la producción en masa, y el hacinamiento de personas en la sociedad, ocasionó condiciones insalubres que causaron muertes masivas, enfermedades crónicas y degenerativas, además de la devastación de los ecosistemas. (5)

La investigación de los efectos adversos que provocan los contaminantes sobre los organismos vivos, empieza en la década de los años 30, por medio de la creación de investigaciones que determinan la relación causa-efecto entre los productos químicos presentes en el agua y los efectos biológicos que producen en los peces. Estos estudios se concentraron mayormente en determinar si un tóxico sospechoso, era el contaminante que provocaba una lesión que se había presentado antes, basándose en pruebas en las especies para determinar su mortalidad, lo que se conoce como «pruebas de toxicidad aguda». (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 6)

Toxicidad aguda y crónica

Los ensayos en los que se mide la toxicidad, son utilizados para distintos objetivos, como por ejemplo, establecer cuáles son las concentraciones que se pueden aceptar midiendo algunos parámetros; y para obtener resultados necesarios para los programas de prevención en salud pública y del medio acuático en relación a los problemas provocados por la presencia de productos tóxicos en las aguas. (Miliarium 2015)

Por no ser un método conveniente desde el punto de vista económico el evaluar la toxicidad específica de cada producto tóxico que se pueda presentar en un medio acuático, se realiza el ensayo de toxicidad englobando todo el medio, por medio del uso de especies acuáticas y observando los resultados. (Miliarium 2015)

Luego de exponer un organismo o un conjunto de ellos a diferentes concentraciones de la muestra a estudio, se valoran y se hace un registro de los efectos biológicos analizados en cada uno de los grupos observados y en los grupos de control, para luego, realizar un análisis mediante métodos estadísticos de los resultados que se obtuvieron. (Miliarium 2015)

El valor del tóxico administrado puede ser expresado de dos maneras:

- **Concentración:** que es la masa del tóxico por unidad de volumen de agua.
- **Dosis:** que es la cantidad de tóxico que ingresa al organismo por unidad de tejido o del ser vivo sobre el que actúa. (Miliarium 2015)

La toxicidad que viven los organismos luego de los ensayos puede ser de dos tipos:

- **Toxicidad aguda:** es el efecto adverso que puede ser de tipo letal o subletal, el cual se aplica sobre las especies utilizadas para una prueba de ensayo, durante un tiempo establecido, que generalmente no dura muchos días. Esta es lo necesariamente grande para iniciar una respuesta rápida en los organismos de prueba, que suele ser de 48 a 96 horas, y que no tiene que llevar a la mortalidad necesariamente.
- **Toxicidad crónica:** es el efecto tóxico a largo plazo, que se mantiene aproximadamente en la décima parte de la vida media de una especie. Esta se relaciona con modificaciones en el metabolismo, crecimiento o la capacidad para sobrevivir del organismo, lo que incluye la muerte y la reducción de la capacidad de reproducción. (Miliarium 2015)

3.3.4. Pruebas de toxicidad

La liberación de sustancias tóxicas en los ecosistemas acuáticos produce gran cantidad de respuestas complejas en los organismos, las que deben ser evaluadas. Por esta razón, se han implementado los bioensayos, que son técnicas en las cuales se evalúan los efectos tóxicos, ya sean agudos o efectos crónicos, que pueden ser de sustancias químicas identificadas como de muestras obtenidas del medio ambiente de

las cuales se desconoce su composición. Estas pruebas de toxicidad tienen el fin de evaluar el efecto de uno o varios contaminantes en los organismos e investiga a los organismos expuestos en un ensayo a distintas concentraciones de un compuesto tóxico con la finalidad de evaluar los cambios que puedan ocurrir en éstos en un determinado período de tiempo. (Silva, y otros 2007, 136)

Los bioensayos son definidos como el método utilizado para evaluar la potencia relativa de una agente toxico (químico o no) sobre un organismo vivo, a través de la comparación de ese agente con el efecto de una solución patrón o estándar. La prueba de toxicidad corresponde al método utilizado para detectar y evaluar la capacidad de un agente dado para producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos; su objetivo primario, además de obtener datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es caracterizar la relación concentración-respuesta del agente. (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 54)

En los últimos años han aumentado la experimentación de bioensayos de toxicidad con agentes contaminantes en organismos vivos bajo condiciones de laboratorio, lo que se debe, a la brevedad con que se obtiene la información sobre las dosis letales y subletales (CL_{50}). La CL_{50} es el valor de la concentración que es letal para el 50% de los organismos sometidos a la influencia de la sustancia estudio, y se expresa en partes por millón (ppm). (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 54)

Las pruebas tóxicas brindan una relación entre la química ambiental, que es la presencia de sustancias en concentraciones mayores a las debidas en sitios donde no se deberían encontrar, las que se miden por medio de análisis de laboratorio; y la ecotoxicología en las que se presentan sustancias que pueden producir efectos biológicos adversos, determinados a través del estudio de organismos individuales por medio de pruebas de toxicidad. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 2)

Un grupo de científicos, académicos y representantes gubernamentales interesados en formalizar las pruebas de toxicidad con organismos vivos se reunieron en 1977. En esa asamblea se analizó todo sobre las características que debían tener dichas pruebas y las clasificaron por orden de importancia con respecto a las siguientes características:

- Capacidad de crear resultados con alto significado ecológico.
- Capacidad de producir información que se pueda defender con criterios científicos y legales.

- Avalados por métodos que se encuentren disponibles normalmente y de gran capacidad de aplicación.
- Predicción de efectos ecológicos.
- Aplicación en una gran cantidad de compuestos diferentes.
- Simplicidad de características en relación a costo-efectividad. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 6-7)

En las pruebas estudiadas en dicha reunión, en lo que se refiere a las investigaciones de la toxicidad aguda tuvieron los resultados más altos, porque presentan la mayor parte o todos los aspectos puntualizados anteriormente. Pese a ello, se debe decir, que este tipo de investigaciones podrían ser limitadas, ya que no porque demuestren que un contaminante cause la mortalidad del 50% de cierto organismo, esto quiere decir que totalmente pueda presentarse un daño ecológico. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 7)

De la misma manera, dichas pruebas no pueden detectar con facilidad los efectos de los elementos que no son letales pero que podrían desacelerar su desarrollo, como el crecimiento o reproducción de las especies, o de sustancias que puedan causar lesiones en una población determinada, con lo cual se podría tener un impacto ecológico grave. Pese a esto, es primordial señalar que las pruebas de toxicidad aguda son muy útiles, ya que favorecen la creación de bases de datos para el estudio de la sensibilidad de las especies a los contaminantes, o de otra manera, de la toxicidad de ciertos compuestos en una especie determinada, de forma fácil y no costosa. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 7)

En los últimos años, los resultados de las pruebas de laboratorio son aprobados como aproximaciones sobre los efectos potenciales de una sustancia en el medio ambiente y se reconoce su importancia para los programas de monitoreo ambiental, como también, para la regulación de sustancias, ya que son herramientas económicas, que ayudan a identificar y evaluar los efectos potenciales de los contaminantes generados por las actividades relacionadas con la agricultura, acuicultura, industria y de áreas urbanas, sobre los componentes biológicos, con lo cual se pueden generar muestras o sitios que necesiten estudios más profundizados y con mayor inversión. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 7)

En todo el mundo se han realizado investigaciones cuyo objetivo es estandarizar las pruebas de toxicidad, así como también escoger grupos con diferentes especies para crear las llamadas «baterías de pruebas», que tienen como objetivo la identificación de los efectos de los contaminantes y de nuevos tóxicos sobre ciertos grupos de especies que pertenezcan a diferentes grupos de importancia ecológica. Así, es probable la detección de un efecto cuando se presentan muestras en las que no se conoce el origen de su toxicidad. Además, se ha tratado de establecer su efectividad y reproducibilidad mediante ejercicios de intercalibración y estandarización con armonía. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 8)

Particularmente para Latinoamérica y en el caso de medios de agua dulce, se debe señalar el trabajo que desarrolló el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá en 1996, cuando científicos varios países del mundo crearon un programa de intercalibración, con el objetivo de la validación de una batería de ensayos por medio de muestras ciegas y posteriormente, la aplicación en muestras ambientales. El resultado fue la publicación de un libro sobre ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 8)

En este momento, existe un gran interés por la elaboración de procedimientos estandarizados para la evaluar la ecotoxicidad de los compuestos, elementos o sustancias químicas potencialmente tóxicas. Por lo cual, es importante el desarrollar la batería de bioensayos, es decir, un número de pruebas biológicas para la evaluación directa de los efectos tóxicos en los organismos y los ecosistemas. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 9)

Criterios para pruebas de toxicidad

Los criterios para seleccionar las pruebas biológicas en el laboratorio y determinar la toxicidad de las sustancias químicas son:

- Factibilidad:
 - Bajo costo.
 - Materiales y reactivos disponibles en la localidad.
 - Tiempo máximo de desarrollo, 5 días.
 - Procedimiento de prueba simple.
 - Facilidad en la evaluación de la respuesta para medición.
- De los organismos:

- Obtención con facilidad (cepario).
 - Mantenimiento con facilidad.
 - Buena representación ecológica.
 - Perteneciente a un grupo funcional (productores primarios, herbívoros, carnívoros, descomponedores).
 - Perteneciente a un grupo taxonómico (bacterias, peces, insectos).
 - Perteneciente a una ruta de exposición (dérmica, ingestión, branquial, combinadas).
 - Con datos en cuanto a su sensibilidad a productos tóxicos (base de datos).
 - Estadio más sensible.
 - Respuesta importante a los productos tóxicos.
 - Sensibilidad a las concentraciones pequeñas.
 - Sensibilidad a una gran diversidad de productos tóxicos.
 - Sensibilidad sin repetición con otros organismos.
 - Con datos biológicos sobre la especie.
- De la prueba:
 - Condiciones presentes en los ecosistemas (temperatura, salinidad, dureza).
 - Concentraciones químicas reales (presentes en el medio ambiente).
 - Seguros y no contaminantes.
 - Estandarización probable.
 - Exactas y análisis preciso.
 - Aplicable universalmente (usos, ventajas y límites).
 - Valoración ecológica de los datos obtenidos.
 - Fácil desarrollo en el laboratorio.
 - Validación de la salud de la especie estudiada.
 - Pequeños requerimientos de sobrevivencia /reproducción en pruebas y testigos.
 - Edad o etapas de vida necesarias al principio de la prueba.
 - Comprobación de las concentraciones nominales. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 11)

La mortalidad debe ser evaluada cada 24 horas y hasta terminar el bioensayo, es decir a las 96 horas; anotando todo sobre el número de organismos afectados, en relación a su movilidad normal o anormal. Los datos de mortalidad acumulados al

terminar la prueba permitirán desarrollar la gráfica concentración-efecto, que es la base para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀). (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 117)

La prueba se usa para determinar los efectos tóxicos agudos de tipo «letales» de efluentes con tratamiento o sin este, muestras de cuerpos de agua, receptores de descargas, compuestos purificados y mezclados de composición conocida o desconocida, principios activos y productos químicos de formulación comercial. También, se requiere para clasificar la toxicidad de compuestos, para la monitorización de ecosistemas acuáticos y para evaluar la eficacia de los sistemas de tratamiento de las aguas residuales. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 117)

3.3.5. Infraestructura en el laboratorio de toxicología

Si un laboratorio pretende desarrollar este tipo de investigaciones toxicológicas, deberá adquirir cámaras bioclimáticas o cuartos con fotoperiodo y temperatura controlados. También, tendrán que contar con la infraestructura adecuada para realizar el cultivo controlado de alimento y para propiciar las condiciones de mantenimiento y reproducción del ensayo. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 117-118)

Material

Los envases en los que se cultivara a los organismos de reproducción, se recomienda que sean de vidrio de borosilicato, del volumen necesario que garantice que no exceda una carga que no pueda soportar el sistema, de acuerdo al volumen de oxígeno disuelto (1 g/L de biomasa en peso fresco). Para los ensayos de toxicidad aguda se deberá utilizar frascos de vidrio de borosilicato de un volumen de 500 mL en adelante para la especie de *Poecilia reticulata*, los que se lavaran adecuadamente para estar seguros que no encuentran contaminados, ya que, por ello, podrían alterarse los resultados. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 118)

Para la realización de los bioensayos es necesario contar con cristalería y materiales adecuados para cumplir con el desarrollo de procedimientos confiables y sistematizados, en los que se pueden incluir pipetas automáticas que deben tener calibración de diferentes volúmenes, matraces aforados con distintas capacidades, pesas para muestras desechables, espátulas de acero inoxidable, y otros. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 118)

Equipo

Los equipos que se necesitan por lo común son los que por lo general los que constan en cualquier laboratorio de análisis biológico, entre los que se cuentan la balanza analítica, potenciómetro, estereomicroscopio, salinómetro oxímetro, cámara bioclimática con control de temperatura, iluminación y fotoperiodo, compresor de aire espectrofotómetro, y bombas sumergibles. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 118)

Reactivos

Ramírez Romero y Mendoza Cantú (2008) distinguen que se deberá contar con los reactivos que generalmente se usan para la preparación del agua de dilución y además de los medios de cultivo, ya sea para los peces como también para la producción de los alimentos que se administrará a los reproductores. Los reactivos deben ser de grado analítico y no tener trazas de metales pesados. (118)

En todos los casos, se recomienda preparar soluciones concentradas «stock», con las que luego se podrá preparar de forma más fácil los medios de cultivo y el agua para diluir. Se debe realizar controles en cuanto a los procedimientos para preparar soluciones concentradas y medios de cultivo, por lo que se debe poner mucho empeño en que los compuestos no se degraden o contaminen, tratando de conservarlos de la mejor manera; por ello en todo momento se aplicarán las condiciones adecuadas de mantenimiento para evitar que la concentración se modifique y que se presenten los cambios químicos de las soluciones. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 119)

3.3.6. Tóxicos de referencia

Se conoce como tóxico de referencia a la sustancia orgánica o inorgánica que se usa para realizar pruebas de toxicidad con el objetivo de controlar la calidad analítica de las especies que se utilizan en dichas pruebas. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 351)

Para que se haga lo anterior, al iniciar la preparación y escoger el método de prueba, se escogerá un compuesto soluble, que tendrá pureza igual o mayor al 99%, al que se le harán pruebas de toxicidad para un organismo determinado, con el objetivo de determinar el intervalo de concentración de dicho compuesto escogido que producirá el efecto que se espera. Cuando ya se establece el patrón de la relación dosis-respuesta

para el compuesto seleccionado, se podrá utilizar como elemento tóxico de referencia. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 351)

El registro histórico de la respuesta al compuesto tóxico de referencia, que se expresa mediante la determinación de CL_{50} / CI_{50} / CE_{50} , es de útil para controlar el estado fisiológico de la especie empleada y se utiliza como prueba para la demostración de la estabilidad de su respuesta biológica. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 351)

Existen varios tóxicos de referencia empleados en diversos estudios publicados. La USEPA en 1993, hace hincapié en la utilización de sustancias como cloruro de sodio (NaCl), cloruro de cadmio ($CdCl_2$), cloruro de potasio (KCl), sulfato de cobre ($CuSO_4$), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Otros organismos como el *Environment Canada* cita al Zinc (II) como un tóxico de referencia inorgánico y al fenol para sustancias orgánicas; pero, estos compuestos se pueden reemplazar por otros según el tipo de organismo escogido, la matriz que se emplea y los puntos finales medidos. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 351)

Para calcular la precisión de los resultados en el laboratorio sobre las pruebas de toxicidad se utilizan las gráficas de control, las cuales son herramientas que ayudan a establecer las diferencias en los resultados y por lo tanto determinan la confiabilidad de un laboratorio en sus resultados. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 351)

Dicromato de potasio

El dicromato de potasio cuya fórmula es $K_2Cr_2O_7$, es una sal perteneciente al ácido dicrómico « $H_2Cr_2O_7$ », el cual, en una sustancia no es estable. Su color típico es el anaranjado intenso. Es una sustancia fuertemente oxidante, que puede producir incendios al tener contacto con sustancias orgánicas. (Acosta Santamaría 2012, 13)

Frente a iones de bario o de plomo (II) en una disolución neutra o poco ácida se precipitan los cromatos que corresponden de manera sólida amarilla. Los dos pueden ser disueltos en ácidos fuertes, y el cromato de plomo además en presencia de base fuerte. Estas sustancias son usadas como pigmentos en distintas pinturas amarillas. (Acosta Santamaría 2012, 13)

En disolución ácida y frente a un cloruro se forma el anión $ClCrO_4^-$, el cual puede ser cristalizado como una sal potásica. A una alta temperatura, con ácido clorhídrico concentrado se convierte en cloruro de cromil (Cl_2CrO_4), la cual, es una

sustancia anaranjada molecular que se destila de la mezcla de reacción. (Acosta Santamaría 2012, 13)

Es frecuentemente empleado en la galvanotécnica para la cromación de otros metales, para fabricar cuero, fabricar pigmentos, como reactivo en las empresas de industrialización química, para recubrir cinc y el magnesio como anticorrosivo y para fabricar preparados de protección de la madera. (Acosta Santamaría 2012, 13)

Es una sustancia tóxica, en contacto con la piel puede producir sensibilización por lo que se pueden presentar alergias; puede ser desencadenante de cáncer a largo plazo; dentro del organismo puede no ser identificada por los canales iónicos con el sulfato y por lo cual alcanzar el núcleo de la célula, atacando a la molécula de ADN. (Acosta Santamaría 2012, 14)

Las características generales de esta sustancia se encuentran en las figuras de los anexos 1 y 2.

Cartas de control de calidad

Ramírez Romero y Mendoza Cantú (2008) distinguen que las cartas de control es la técnica de registro que indica cuáles son los componentes que sirven para determinar los intervalos que son aceptados en cuanto a la variación de respuesta de la especie para el ensayo frente a una sustancia tóxica de referencia, con un margen de confianza del 95%; por lo tanto, es la herramienta referencial, que sirve para controlar la sensibilidad del organismo que se usa, la estabilidad de la respuesta biológica y la medición de resultados finales exactos. (352)

La carta de control se elabora desde el inicio de los resultados de varias pruebas con la sustancia que es referida como tóxico; para esto, para lo cual se busca la cifra de la concentración letal media (CL_{50} / CI_{50} / CE_{50}). Al principio, se puede elaborar con por lo menos cinco datos y luego se deberá seguir realizando ensayos con el tóxico de referencia, para obtener cada mes nuevos valores hasta llegar a un número de veinte resultados. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 352)

Ya obtenidos todos los valores, se emplean para calcular el resultado del promedio final y la desviación estándar (σ) de los datos obtenidos. Con estos métodos estadísticos se calculan los valores de los límites superior e inferior, que establecen el intervalo de confianza (95%), en el que se encontraran los valores de CL_{50} / CI_{50} / CE_{50} ,

que se obtienen para otros ensayos con el mismo tóxico de referencia en un futuro. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 352)

Preparación de soluciones de control

Ramírez Romero y Mendoza Cantú (2008) opinan que, regularmente, como control positivo se usa una solución del tóxico de referencia con una concentración aproximada a la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$. Para elaborarla, se inicia preparando una solución estándar altamente concentrada, desde la que se obtienen soluciones con menor concentración, empleando agua dura reconstituida como medio de disolución o el medio que se recomienda para cada una de las pruebas. (355)

En cada uno de estos experimentos se debe utilizar la preparación de las sustancias que actuaran como referencia, que deberán ser puros al menos con un 99.5% y material volumétrico clase A calibrado. Las diluciones se prepararan hasta obtener una concentración con un valor parecido al resultado promedio de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ que se resulta comúnmente en los laboratorios. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008)

La sustancia del compuesto tóxico de referencia se debe guardar en envases color ámbar o a su vez con una cubierta de papel aluminio en un lugar que no esté al alcance de la luz, refrigerada a una temperatura entre $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Siendo almacenada en estas circunstancias, la solución de prueba puede mantenerse estable más de 45 días y la solución estándar por más de 6 meses. Si no pasa nada inesperado con los resultados determinados por la carta control del tóxico de referencia, los patrones pueden ser utilizados por un largo lapso de tiempo; pero se recomienda la renovación a los 45 días y a los 6 meses, según lo dicho anteriormente. También se recomienda que la solución química sea valorada químicamente. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 356)

Ramírez Romero y Mendoza Cantú (2008) mencionan que el control negativo tiene que ver con una solución en donde se cultiva la especie, o puede usarse agua con las características de pH, dureza y alcalinidad acordes para que puedan desarrollarse de la mejor manera cada especie utilizada, o también agua salina, como por ejemplo si se trata de *Vibrio fischeri*. En cualquier solución que se escoja se encuentra un porcentaje de efecto máximo que no debe superarse mientras se desarrolla el ensayo. Estos controles tienen realizarse mediante los procedimientos recomendados en cada prueba. (356-357)

3.3.7. Selección de organismos para pruebas

Para conseguir la máxima información de los bioensayos se necesita seleccionar los organismos mayormente adecuados. Se debe considerar que se requiere distintos períodos de aclimatación en el laboratorio, dependiendo de cada especie, y es de gran importancia que los organismos de ensayo se manipulen cuidadosamente, no se dañen, estén sanos y tengan la edad y tamaño uniformes (FAO 1981). Según Henry (1988) la selección de organismos para los bioensayos se deben basar en:

- Los objetivos del programa toxicológico.
- La información disponible sobre los posibles organismos.
- Las características de las especies.
- Las instalaciones y equipos de laboratorio.
- El nivel de capacitación de los técnicos. (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 62-63)

Los organismos acuáticos comúnmente presentan ciclos de vida y requerimientos de cultivo y de manejo complejos. Desarrollar y adquirir toda esta información es una ardua tarea que generalmente requiere muchos años de estudio. Se aconseja que se tomen en cuenta solo los organismos de los que se tiene la información necesaria para cada uno de los fines expuestos. Los organismos con información limitada sobre cultivo y procedimientos de prueba deberían ser evitados. (Barros Santiago y Gámez Rojas 2008, 63)

Ramírez Romero y Mendoza Cantú (2008) mencionan que los laboratorios que realicen este tipo de pruebas para bioensayos deben contar con la cepa adecuada, y conseguir su estabilización mediante el instructivo determinado para el mantenimiento de dicha especie que forma parte del ensayo. Se debe hacer un seguimiento de los grupos de reproductores, tomando mucho en cuenta cualquier signo de alteración anormal del organismo, ya que esto podría significar que el cultivo es inadecuado en el que influyen factores ambientales e inadecuado manejo del sistema de producción que podrían dañar la calidad del organismo a prueba y alterar su respuesta mientras se realiza el bioensayo. (119)

Para iniciar los cultivos se deben utilizar especies con hembras y machos sanos, y cuya alimentación debe estar controlada. Las especies usadas como prueba para los bioensayos deben ser obtenidas lotes estables y de control, para lo cual se dejará

establecido un tiempo máximo del lote para la reproducción de las crías, que va a depender de la especie seleccionada. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 119)

Generalidades de la especie *Poecilia reticulata* (pez guppy)

En un informe realizado por la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca [CVC] y Universidad del Valle (2007) se describió que “los peces, como un importante recurso alimenticio, constituyen una de las vías principales para la transferencia de metales pesados al hombre, considerado esto de gran importancia para su empleo como organismos indicadores” (3.4).

El pez guppy fue detallado por tres científicos; el primero fue Peters un zoólogo alemán en 1859, el cual le dio el nombre de "*Poecilia reticulata*"; luego en 1863 el italiano naturalista de Filippi, lo menciona como "*Lebistes poeciloides*"; y luego, en 1866, John Lechmere Guppy lo bautiza como "*Girardinus guppy*", del primero viene el nombre científico, y del último el nombre común. (Vivapets 2015)

Los peces guppys habitan en aguas con temperatura caliente, de entre 22°C y 28°C, con un promedio de 25°C, pero pueden tolerar el agua con condiciones de temperatura ambiente. Es necesario que el agua tenga un pH con ligera alcalinidad, pero no menor a 6,5 o mayor a 8, y la dureza entre 10° y 18°dGH, con un máximo 20°dGH. (Wikispaces 2011)

Los peces guppy miden de 3 a 6cm en el caso de los machos, en cambio las hembras pueden llegar hasta 6 a 8cms de longitud. En su hábitat natural, los peces guppys suelen ser poco coloridos, presentan una mancha de color oscuro a nivel de la línea media detrás del opérculo, pero los criadores han conseguido producir un sinnúmero de colores para esta especie. (Vivapets 2015)

El número de organismos que se pueden colocar en un medio de crianza va a depender de varios factores, pero es recomendable que se críe 1 guppy por cada 5 litros de agua en un acuario, el cual deberá tener la capacidad para al menos 40 litros, porque es una especie muy inquieta, por lo que requieren de algo de espacio para moverse. (Pérez 2015)

Se recomienda que los acuarios dispongan de filtro y oxigenador para que el agua esté estable, con lo cual se ayudará a que el promedio de vida de los peces sea más alto, así como su reproducción. (Angulo 2014)

El pez guppy es muy sensible al sulfato de cobre, que es usada generalmente para eliminar caracoles en los acuarios, lo que muchas veces provoca la muerte de un número considerable de peces, por el desconocimiento de esta sensibilidad. Por lo tanto se recomienda usar el sulfato de cobre con un máximo de 0.12 partes por millón. (Angulo 2014)

Estos peces se alimentan principalmente de la superficie y menos del fondo, como indica su boca, posicionada en la parte superior de la cabeza, aunque pueden bucear hasta el fondo y picotear pedazos de comida de otros lugares sin problemas. Tienen un metabolismo muy rápido y se recomienda, en la medida de lo posible, alimentarlos poca cantidad pero varias veces al día (a partir de un mínimo de dos). (Pérez 2015)

En su entorno natural, la alimentación de los guppys se basa en larvas de mosquito rojo y por eso esta especie es empleada para controlar la población de mosquitos en algunos países y prevenir la malaria. En cautiverio aceptan muchos tipos de alimentación como pueden ser el alimento en escamas, copos, pastillas de algas y alimento liofilizado (como bloques de tubifex). (Pérez 2015)

El pez guppy, es un poecílido, que igualmente como otros de su especie, ha sido utilizado grandemente en estudios de evaluación de toxicidad de efluentes industriales, de contaminantes orgánicos y de contaminación de aguas naturales, de acuerdo con su adecuado tamaño para el cultivo y reproducción en condiciones de laboratorio. Esta especie presenta dimorfismo sexual, lo que favorece la diferenciación entre los machos y las hembras. (CVC y Universidad del Valle 2007, 3.4)

Cultivo y mantenimiento de la especie de prueba

Según el lote de reproductores se obtendrán los organismos para la prueba. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 120)

En el caso de *Poecilia reticulata*, por ser un pez vivíparo, que también presenta un marcado dimorfismo sexual, facilita enormemente el mantenimiento de los reproductores y la producción de crías como organismos de prueba. Con esta especie es factible obtener resultados exitosos, alimentándolo exclusivamente con alimento balanceados a base de hojuelas, aunque un complemento periódico de alimento vivo (p. ej., el cladóceros *Moinamacrocopa*), favorece mejores resultados de reproducción. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 121)

Para cultivar los reproductores se utilizaran recipientes con las condiciones adecuadas para la crecimiento de los adultos, preferible que sean acuarios de vidrio con un volumen 20 L. En cada recipiente no se deberá superar la densidad de 1 g/L de biomasa (peso húmedo) de los organismos, y el medio de cultivo será el agua reconstituida semidura. La temperatura ideal para el cultivo se establecerá entre 25 y 27 °C, con un fotoperiodo de 16:8 (horas luz: horas oscuridad); el tipo de iluminación será la que disponga el laboratorio (1,000 luxes). (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 120)

En el caso de *Poecilia reticulata*, debido a su dimorfismo sexual se hace más fácil poner en los recipientes para la reproducción una proporción 1:1 de machos y hembras. Cuando las hembras son fecundadas, se identifican debido a su mayor tamaño y se visualiza el crecimiento abdominal mientras avanza el periodo de gestación, en este punto se las separa con mucha minuciosidad y se colocan en las redes incubadoras, que presentan una malla con abertura adecuada para que las crías salgan sin ningún problema, cuando nacen, pero con la retención de las hembras adultas para evitar que se coman a las crías. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 123)

Otra recomendación sería que el mantenimiento y la reproducción se realicen dentro de un sistema para cultivarlos que sea cerrado, en el cual el agua sea recirculada, con el mantenimiento de las siguientes condiciones de calidad: Amonio <0.002 mg/L, Nitrito n. d. mg/L, Nitrato 20 mg/L, pH 7.5- 8.0, Temperatura 25±1 °C, Oxígeno >5.0 mg/L y % saturación Oxígeno >77. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 123)

De acuerdo a las condiciones explicadas anteriormente, se puede garantizar que el material biológico sea de excelente calidad y asimismo se disminuye la posibilidad de resultados alterados. En cualquier caso, en un tiempo mayor a 3 meses, se deberá realizar varios ensayos con la sustancia tóxica referencial, como por ejemplo, el dicromato de potasio. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 123)

Aclimatación de los organismos de prueba

El proceso de aclimatación va a depender en gran parte del organismo de prueba empleado. Por lo que es importante el procedimiento y las condiciones bajo las cuales se debe realizar dicho proceso, que en este caso es de nuestro interés la especie de prueba *Poecilia reticulata*.

Para aclimatar esta especie se puede usar por ejemplo, la metodología propuesta por la APHA (1999), que consiste en acondicionar al inicio, un espacio dentro del Laboratorio de Bioensayos que permita adaptar gradualmente los peces a la temperatura a la cual se realizaran las pruebas de toxicidad (20 ± 2 °C). Se deben ubicar los peces en lotes de 100 por acuarios de 60 litros, donde se mezclará el agua que proviene del criadero con agua reconstituida en el laboratorio con el propósito de realizar una aclimatación gradual a la misma. (CVC y Universidad del Valle 2007, 3.6)

3.3.8. Preparación del material

Se debe seguir al pie de la letra los parámetros básicos para que la calidad en la respuesta de la especie puesta a prueba sea confiable y exacta, por lo que no se debe permitir alguna interacción o alteración, por la presencia de residuos de otros compuestos tóxicos remanentes o provenientes del material utilizado en los bioensayos, como la cristalería de los envases. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 124)

3.3.9. Expresión de los resultados

Con los resultados de mortalidad o efectos letales a 96 horas se desarrollará la tabla de mortalidad que se ha ido acumulando en todo momento en que se realizaron las determinaciones; con estos datos de 96 horas se tendrá un valor aproximado de la CL_{50} . Hay varios programas de pc que pueden calcular estos resultados de forma fácil, que incluyen determinar el intervalo de confianza. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 126)

Es importante brindar la referencia del método y del software que se utilizó. Ya sean compuestos puros o mezclados, principios activos y productos por formulación, se debe clasificar el grado de toxicidad según el valor de la CL_{50} y mediante las tablas que se disponen para dicho fin. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 126)

3.3.10. Aseguramiento y control de calidad de los ensayos de toxicidad

El uso de métodos aprobados y estandarizados es un recurso primordial en el muestreo y análisis de muestras ambientales, pero el empleo de dichos métodos en solitario no asegura que se alcancen resultados de confianza, reales y analíticos. Circunstancias como interferencias en la matriz empleada, equipos defectuosos y

equivocaciones de los investigadores pueden poner en duda la exactitud en los resultados. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 347)

La calidad del análisis en las pruebas de toxicidad es un reto difícil de superar, ya que además de las razones puntualizadas anteriormente que afectan la exactitud de los resultados, existen otros factores como la variabilidad natural los organismos de prueba, el estado de salud de las personas y las condiciones del medio ambiente que se dan mientras ocurren las pruebas, que podrían ayudar al desarrollo de resultados alterados. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 347)

Ramírez Romero y Mendoza Cantú (2008) puntualizan que, se necesita tener resultados en los que se pueda confiar y que puedan ser reproducidos; por eso, los laboratorios deben disponer de programas que controlen la calidad y que demuestren con exactitud los datos obtenidos. Para validar y aprobar los resultados comprobados en los bioensayos se requiere de un programa de aseguramiento y control de calidad (ACC), el cual debe estar bien diseñado y se debe aplicar periódicamente. Este programa debe producir valores que puedan ser probados técnicamente y defenderse legalmente. (348)

Debe establecerse cuales son los procedimientos de control de calidad y las actividades que por obligación se van a realizar mientras se desarrollen las pruebas de toxicidad. Dichas actividades pueden ser de manejo y de funcionamiento. Las actividades de manejo tienen que ver con los planes operativos donde son especificados los procedimientos estandarizados y los resultados finales altamente confiables, y las actividades de funcionamiento se refieren al conjunto de medidas que se aplican durante los protocolos de análisis. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 348)

Estos procedimientos favorecerán los resultados con un aseguramiento estricto y determinarán la calidad de las evaluaciones del laboratorio a través de pruebas internas y externas controladas; lo que encierra al análisis de las muestras que se evalúan mediante su comportamiento, y también el análisis de los resultados comparándolos con los de los demás laboratorios y el levantamiento de auditorías. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 348)

3.3.11. Protocolos de prueba

Uno de los inconvenientes que se presentan en relación con los programas de control de calidad de las pruebas de toxicidad es el desarrollo de un sin número de pruebas, de las cuales su mayor parte no son estandarizadas. Solamente un pequeño porcentaje de ellas han sido aprobadas y validadas por organizaciones de control, que constan de métodos que pueden ser incluidos en los experimentos de los laboratorios dedicados a este tipo de investigaciones. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 349)

3.3.12. Objetivos finales de las pruebas de toxicidad

El objetivo principal de los ensayos de toxicidad en una muestra de agua, efluente o compuesto puro es determinar la concentración segura o la concentración en la que no se encuentra efecto alguna; pero, esta definición debe ser sustentada mediante métodos estadísticos, para lo cual se deberán emplear:

- La mayor concentración en la que no aparece efecto (NOEC).
- La menor concentración a la que se ve efecto (LOEC).
- La concentración efectiva (CE), que es una aproximación de la concentración del tóxico de referencia que podría provocar un efecto adverso manifestado por una respuesta pequeña en la cantidad de organismos a prueba.
- La concentración letal (CL), que se refiere a la concentración del tóxico de referencia o efluente o muestra que provoca la mortalidad de un número determinado de los organismos expuestos.
- La concentración inhibitoria (CI), que es la concentración del compuesto tóxico, muestra o efluente que podría producir el descenso de la respuesta biológica en una determinada especie expuesta. (Ramírez Romero y Mendoza Cantú 2008, 359)

3.3.13. Descargas de aguas residuales industriales en la franja costera

Uno de los objetivos del Programa de Manejo de Recursos Costeros «PMRC», es desarrollar programas que mejoren la calidad de vida de las personas, mediante proyectos que ayuden a impedir la práctica de vertientes de componentes químicos

industrializados en las aguas residuales provoque daños en las personas. (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 1)

El PMRC, contrató un Programa de monitoreo y prevención, que permita disminuir el impacto ambiental que generan las aguas residuales industrializadas en los cantones de la costa. (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 2)

Para el diseño de un programa de monitoreo que supervise los efluentes que se vierten en la zona costera del Ecuador, se necesita la colaboración de las municipalidades, basados en criterios técnicos y respaldados administrativamente por cada entidad pública, que serán partícipes del proyecto. (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 5)

Los municipios deberán controlar por medio de sus propios estándares de calidad ambiental, plantear normativas y ordenanzas locales que sean dependientes de los criterios ya establecidos con para el uso asignado de las aguas, de acuerdo al Reglamento para la Prevención y Control de la Contaminación. (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 24)

Está prohibido verter desechos líquidos en las vías públicas, canales de riego y drenaje, sistemas de recolección de aguas lluvias y subterráneas. (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 24)

De acuerdo a las normas vigentes mencionadas anteriormente, está prohibido verter en el sistema de alcantarillado de cualquier localidad, cualquier sustancia o compuesto que pueda bloquear el libre paso o acceso de sistema, pudiendo además formar gases tóxicos, malos olores o lesionar las estructuras significativamente. (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 27)

“Entre las principales acciones que determinan el éxito de un programa de monitoreo, se encuentran las mediciones en campo, in-situ, y el desarrollo de ensayos de laboratorio, esto es la caracterización de las muestras” (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 40).

El laboratorio encargado de desarrollar ensayos del grado de contaminación de los efluentes o cuerpos receptores deberá poseer buenas prácticas de laboratorio, seguir métodos normalizados de análisis y preferiblemente estar certificado por alguna norma internacional de laboratorios y/o acreditado por el Organismo de Acreditación Ecuatoriano – OAE. (Sistema de Información Marino Costera del Ecuador 2015, 42)

4. Visualización del Alcance del Estudio

Con el presente trabajo serán beneficiados profesionales y estudiantes en las ramas de ciencias químicas, ecoturismo y medio ambiente, toxicología y acuicultura; y la población en general, ya que al concluir el mismo, se estandarizara un protocolo de gran importancia, y se dotara de un protocolo de material informativo y educativo sobre Ecotoxicología y la exposición del pez guppy al dicromato de potasio su toxicidad aguda; ya que no se cuenta en nuestra sociedad con un protocolo científicamente estandarizado y comprobado sobre este tema.

Además, es de gran importancia para la Universidad Técnica de Manabí y para la comunidad manabita, el desarrollar un protocolo con estándares internacionales sobre ecotoxicidad aguda en la especie *Poecilia reticulata* expuesta al dicromato de potasio y su aplicación, ya que con esto se contribuye con bases científicas sólidas a la investigación de toda persona que necesite una referencia para medir estos parámetros. Este trabajo será de mucho orgullo para nuestra Universidad y localidad, ya que demostrará que en nuestro medio también se pueden desarrollar este tipo de investigaciones, por lo que tendrá el debido reconocimiento científico.

5. Elaboración de Hipótesis y Definición de Variables

5.1. Hipótesis.

En el análisis de la determinación estándar de la CL50 del pez guppy, el porcentaje de mortalidad se relaciona con la CL50 de dicromato de potasio obtenido en el ensayo realizado en el Laboratorio de Ecotoxicología de la UTM, comparado con el propuesto en la literatura.

5.2. Variables y su Operacionalización.

5.2.1. Variables

Variable independiente

Concentración de dicromato de potasio, bajo estándar de solubilidad de acuerdo a normativa OECD 423 de toxicidad aguda.

Variable dependiente

Porcentaje de mortalidad del pez guppy (*Poecilia reticulata*), de la muestra en el ensayo, efectos letales, efectos subletales.

5.2.2. Operacionalización de las variables

Variable independiente. Concentración de dicromato de potasio, bajo estándar de solubilidad de acuerdo a normativa OECD 423 de toxicidad aguda.

CONCEPTUALIZACIÓN	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
La estandarización ecotoxicológica pretende desarrollar protocolos estandarizados que se usen como medios predictivos precoces, que ayuden a definir umbrales permisibles y de guíen a las entidades reguladoras para la toma de decisiones. (Sobrero 2010, 3)			
Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico que ayuden a establecer los efectos los componentes físicos y químicos en especies de prueba por medio de protocolos establecidos y de control. (Sobrero 2010, 3)	Clasificación de peligro del medio acuático	Concentración efectiva media (CL ₅₀)	< 1 mg/L (muy tóxica R50) 1-10 mg/L (tóxica R51) 10-100 mg/L (nociva R52) > 100mg/L (no es peligrosa)
Los efectos pueden ser evaluarse por la reacción de las especies, como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. (Sobrero 2010, 3)			

Variable dependiente. Porcentaje de mortalidad del pez guppy (*Poecilia reticulata*), de la muestra en el ensayo, efectos letales, efectos subletales.

CONCEPTUALIZACIÓN	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
El estudio del riesgo ecológico es un procedimiento para calcular magnitudes y probabilidades de la presentación de efectos negativos de las actividades antrópicas y catástrofes del medio ambiente; utiliza métodos de predicción para evaluar la exposición, así como para determinar los efectos de sustancias tóxicas a diferentes niveles de organización de las especies y escala trófica. Los efectos han venido siendo estudiados en el nivel de los organismos, en este caso de los peces (<i>Poecilia reticulata</i>), de las poblaciones y de los ecosistemas. (Badii y Garza Almanza 2005, 17)	Características de la población objeto de estudio (pez guppy).	Sexo	Masculino Femenino
	Evaluación de la mortalidad con dicromato de potasio en 96 h	Toxicidad aguda	Número de organismos fallecidos Pérdida de la movilidad

6. Diseño de Investigación

6.1. Objetivos

6.1.1. Objetivo general

Estandarizar el protocolo para la evaluación ecotoxicológica de agua dulce mediante la determinación de la CL₅₀ de dicromato de potasio en pez guppy (*Poecilia reticulata*).

6.1.2. Objetivos específicos

- Describir los parámetros y procedimientos necesarios para la evaluación ecotoxicológica de agua dulce, mediante ensayos de CL₅₀ en el pez guppy (*Poecilia reticulata*) con dicromato de potasio como sustancia patrón.
- Exponer al pez guppy a diferentes concentraciones de dicromato de potasio para estandarizar su CL₅₀, en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Técnica de Manabí.
- Identificar y tabular los resultados obtenidos mediante la relación dosis – respuesta, para determinar su CL₅₀.
- Implementar los equipos, accesorios y reactivos necesarios para la estandarización del protocolo de evaluación ecotoxicológica de agua dulce mediante ensayos en pez guppy.

Con el fin de lograr los objetivos propuestos en esta investigación, se utilizó un enfoque cuantitativo, debido a que se conoce la realidad del contexto a investigar, se tiene una comprensión de hechos y control sobre el objeto de estudio.

6.2. Tipo de investigación

Se desarrolló un trabajo de tipo descriptivo y correlacional con diseño experimental mediante ensayos. La investigación es descriptiva, debido a que se describió las características de la población objeto de estudio, es decir de los peces guppys, en cuanto a sexo y los resultados específicos del experimento mediante la evaluación de la mortalidad con dicromato de potasio en 96 h, para determinar la

toxicidad aguda. Los estudios ecotoxicológicos complementan los resultados de los parámetros físicos-químicos y biológicos.

6.3. Métodos

Los métodos que se emplearon para el desarrollo del presente estudio son los siguientes:

- Método inductivo: Se realizó un análisis de la aplicación de la tecnología a desarrollar para determinar el modelo biológico óptimo que se utilizó para los ensayos ecotoxicológicos.
- Bioensayos ecotoxicológicos: Para determinar la posible toxicidad de sustancias patrones como el dicromato de potasio se realizaron ensayos ecotoxicológicos en biomodelos experimentales (*Poecilia reticulata*) de acuerdo a los puntos críticos determinados para el contaminante.
- Métodos estadísticos: En cuanto a la tabulación, así como la presentación de los datos e interpretación de los resultados en el presente estudio, se utilizaron fichas de recolección de información, describiendo y resumiendo los resultados más importantes obtenidos en el análisis del bioensayo.

Los datos después de procesados, fueron presentados en forma de tablas y gráficos mediante la utilización del Microsoft Excel 2013 por diferentes métodos como el Probit, de estimación gráfica y el Reed Muench, también se empleó el software para la determinación de la CL_{50} con el método Probit dado por la EPA: además se compararon los resultados obtenidos como la CL_{50} utilizando un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 0,05 y un nivel de confianza del 95%, empleando el software estadístico Statgraphics.

6.4. Diseño experimental

En la presente investigación se realizaron ensayos ecotoxicológicos *in situ* de toxicidad aguda y el parámetro empleado es la concentración letal media (CL_{50}), la cual señala la concentración (en este caso dilución de la muestra) que ocasiona la mortalidad del 50% de la población expuesta al contaminante. Se realizaron un ensayo con tres réplicas y un nivel de análisis, con la sustancia de ensayo en dilución (dicromato de potasio).

7. Definición y Selección de la Muestra

7.1. Ensayo

7.1.1. Procedimiento de esterilización

Para los ensayos se adquirió alevines de la especie de pez *Poecilia reticulata* con una edad menor a 24 horas, contenidos en recipientes de vidrio en forma de peceras los cuales se mantenían con aireación y una alimentación adecuada.

La esterilización es un procedimiento que encierra todos los procesos físicos, mecánicos y químicos que se utilizan emplean para eliminar o mantener bacterias adecuadas, por lo cual se consigue establecer la asepsia necesaria.

Para la preparación del bioensayo se utilizó cristalería y materiales adecuados y suficientes para garantizar que los procedimientos sean seguros y repetibles, contando con todas las normas vigentes de asepsia para las pruebas. Estos materiales fueron esterilizados previamente para garantizar un resultado final exitoso y así evitar la presencia de agentes contaminantes.

7.1.2. Preparación de agua de dilución y medios de cultivo

Los alevines se mantenían con alimento balanceado en hojuelas (mezcla de harina de pescado y harina de maíz).

Para el cultivo de reproductores se emplearon acuarios de vidrio de 20 L. La densidad de las especies en estudio no superó 1 g/L de biomasa, que es acorde a las normas descritas. Como medio de cultivo se utilizó agua reconstituida semidura. La temperatura para el cultivo osciló entre 25 y 27 °C, y el fotoperiodo fue de 16:8; la iluminación fue la misma del entorno del ambiente.

Las hembras fecundadas, fueron cuidadosamente separadas y colocadas en redes incubadoras, las cuales constaban con un sistema cerrado en el cual el agua se mantuvo con las siguientes condiciones de calidad: Amonio <0.002 mg/L, Nitrito n. d. mg/L, Nitrate 20 mg/L, pH 7.5- 8.0, Temperatura 25±1 °C, Oxígeno >5.0 mg/L y % saturación Oxígeno >77.

Dadas las condiciones antes descritas, se garantizó la calidad del material biológico y se disminuyó significativamente errores en los resultados. Una vez paridas

las hembras, se procedió a exponer los alevines guppy (< 24 h) al tóxico de referencia (dicromato de potasio) para realizar los ensayos ecotoxicológicos.

7.1.3. Preparación de la serie de dilución de la sustancia tóxica

Las soluciones para las pruebas de toxicidad fueron preparadas con agua dulce, además de la solución madre del tóxico de referencia la cual fue preparada con agua destilada cuyos valores de TDS mostraron su nivel de pureza.

Los ensayos se realizaron con cinco concentraciones distintas expresadas en partes por millón (ppm) de la sustancia toxica y otra de control por triplicado obteniendo el test definitivo, teniendo en consideración que la literatura indica como mínimo dos réplicas, para que los resultados sean estadísticamente representativos.

Las soluciones se prepararon al momento en el cual iban a ser usados unos minutos antes de realizar los ensayos de toxicidad, las soluciones se prepararon bajo temperatura ambiente revisando que el pH y temperatura del agua no se vieran alterados, para evitar la mortandad de los organismos a prueba debido al cambio de temperatura de la misma.

Preparación de solución madre de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Para realizar pruebas de toxicidad con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), antes de preparar las diferentes concentraciones se creó una solución madre de la cual partirían las demás concentraciones diluidas.

- Primero se revisó el reactivo a emplear en este caso dicromato de potasio, que no estuviese caducado y revisando su pureza, y las consideraciones para su manipulación indicadas en la etiqueta marca MERCK.
- Se determinó los gramos necesarios que se utilizarán para la preparación de la solución madre mediante la ley ambiental cuyos valores ya están establecidos y no se necesita de realizar cálculos para saber cuál será la cantidad que se utilizará para la preparación de la solución madre.
 - Agua de uso humano, alcantarillado, agua dulce: 0,05 mg/lit.
 - Agua subterránea: 0,05 mg/lit.
 - Agua uso agrícola: 0,1 mg/lit.
 - Agua de uso pecuario 1 mg/lit.

Pero solo se usó el primer valor que corresponde al agua de uso humano, alcantarillado, agua dulce cuyo valor mínimo es de 0,05 mg/lit y se tomó como referencia el valor máximo que es 1 mg/lit.

- Una vez que se determinó los gramos necesarios para tal concentración, se pasan aproximadamente 1 mg de $K_2Cr_2O_7$ para obtener una concentración de 1 ppm. En nuestro caso se pesó 0,01 g de $K_2Cr_2O_7$, debido a que la balanza analítica que se utilizó se encontraba en gramos.
- Después de pesar se diluyó en un vaso de precipitación en 500 ml de agua destilada traspasando su contenido a un matraz aforado hasta los 1000 ml con agua destilada.
- Se dejó reposar un momento para luego proceder a hacer las diferentes diluciones con variadas concentraciones.

Preparación de soluciones a partir de la solución madre de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Con la solución madre de 1 ppm se procedió a realizar las diferentes concentraciones:

Para cada una de las soluciones se utilizó un matraz aforado de 1000 ml, el cuál fue de ayuda para las distintas concentraciones ya que para cada solución se utilizó 500 ml de agua destilada y se completó los 1000 ml con 500 ml de la solución madre y así sucesivamente partían las demás soluciones de cada una de las que se iban preparando.

Solución mínima de 0,05 ppm a partir de la solución madre de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 25%

- Esta solución se determina de la siguiente manera:
- Se toma un matraz aforado de 1000 ml asegurándose que se encuentre limpio y sin ningún residuo y posteriormente se procede a llenar con 500 ml de agua destilada.
- Luego se extraen 500 ml de la solución madre de dicromato ya preparada, con ayuda de un vaso de precipitación.

En el agua destilada se diluyen los 500 ml que se extrajeron de la solución madre completando los 1000 ml, se agita un poco con las condiciones mencionadas anteriormente, para mantener una concentración de 0,05 ppm.

Solución de 0,125 ppm a partir de la solución madre de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 50%

- Se empieza calculando el volumen necesario requerido de la solución anterior el cual es:

$$V_1 = \frac{500 \text{ ml} * 1 \text{ ppm}}{1 \text{ ppm}} = 500 \text{ ml}$$

- Una vez calculado el volumen, con ayuda de vaso de precipitación, previamente esterilizado se extraen los 500 ml de la primera solución (0,05 ppm) preparada anteriormente.
- Luego en un matraz aforado de 1000 ml se coloca 500 ml de agua destilada para diluirlo con el volumen que se extrajo con las condiciones mencionadas anteriormente hasta llenar los 1000 ml, para mantener una concentración de 0,125 ppm.

Solución de 0,25 ppm a partir de la solución madre de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 75%

- Se utiliza la misma fórmula anterior por lo que se sigue el mismo procedimiento, ya que se necesita saber el volumen que se tomará de la solución de 0,125, por lo tanto al utilizar la misma fórmula y como referencia los mismos valores no va a dar lo mismo y el cuál es:

$$V_1 = \frac{500 \text{ ml} * 1 \text{ ppm}}{1 \text{ ppm}} = 500 \text{ ml}$$

- Ya calculado el volumen necesario de forma analítica, con ayuda de un vaso de precipitación, previamente esterilizado se extraen los 500 ml de la solución anterior (0,125 ppm).
- Luego en un matraz aforado de 1000 ml se coloca 500 ml de agua destilada para diluirlo con el volumen que se extrajo con las condiciones mencionadas anteriormente hasta llenar los 1000 ml, para mantener una concentración de 0,25 ppm.

Solución de 0,5 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 100%

- Como se sigue el mismo procedimiento en cada una de las soluciones al utilizar la misma fórmula nos dará como resultado 500 ml, valor que es determinado

analíticamente, por lo tanto esos 500 ml es el volumen necesario para la concentración deseada, empleando un vaso de precipitación, previamente esterilizado se extrae dicha cantidad de la solución preparada anteriormente (0,25 ppm)

- Luego en un matraz aforado de 1000 ml se coloca 500 ml de agua destilada para diluirlo con el volumen que se extrajo con las condiciones mencionadas anteriormente hasta llenar los 1000 ml, para mantener una concentración de 0,5 ppm.

Solución máxima de 1 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 100%

- Como ya sabemos la cantidad que se necesitará de la solución anterior por lo que sigue el mismo procedimiento y al utilizar la misma fórmula nos dará como resultado 500 ml, valor que es determinado analíticamente, por lo tanto ese será volumen necesario para la concentración deseada, empleando un vaso de precipitación, previamente esterilizado se extrae dicha cantidad de la solución preparada anteriormente (0,5 ppm)

Luego en un matraz aforado de 1000 ml se coloca 500 ml de agua destilada para diluirlo con el volumen que se extrajo con las condiciones mencionadas anteriormente hasta llenar los 1000 ml, para mantener una concentración de 1 ppm.

7.1.4. Pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad fueron realizadas basadas en protocolos ya establecidos por diferentes estudios internacionales de países como México, y organizaciones como la USEPA OECD, el cual tiene como objetivo determinar la concentración CL_{50} de una sustancia pura como agente tóxico, con relación a la dosis tiempo.

El principio de la prueba de toxicidad se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte de 50% de los peces de la especie *Poecilia reticulata* en 24 horas bajo las concentraciones descritas para este procedimiento. Esta concentración es conocida como CL_{50} , y como se ha mencionado anteriormente, deben llevarse a cabo empleando un variado rango de concentraciones con el fin de establecer el 0 y 50% de mortalidad del tóxico sobre los organismos expuestos, que permitirán la obtención de las respectivas CL_{50} .

En las pruebas se utilizaron diez (10) organismos (*Poecilia reticulata* < 24 h de nacidos) por recipiente, basándose en los protocolos establecidos, con placas de cuatro concentraciones diferentes, más el blanco o control negativo y tres réplicas por ensayo con un total de 15 recipientes para el ensayo toxicológico, 150 organismos en total, como se muestra en el siguiente esquema:

A continuación, se explica más detalladamente el proceso:

- Para el llenado de los vasos de precipitación con diferentes soluciones como ya se ha mencionado se utiliza 15 vasos de precipitación en total. Los tres primeros son de control utilizando simplemente una solución de agua dulce de 500 ml, sin reactivo, la cual se conoce como blanco. Luego se preparan 3 vasos de precipitación con 500 ml de la solución de 0,05 ppm. Tres más con 500 ml de la solución de 0,125 ppm, 3 con 500 ml de la solución a 0,25 ppm, tres más con 500 ml de la solución de 0,5 y por último, 3 vasos de precipitación con 500 ml a 1 ppm. Se rotula cada uno indicando la concentración, para evitar conclusiones futuras que alteren el resultado final.
- Para la transferencia de alevines del pez *Poecilia reticulata*, se toma una muestra del eclosionador de unos 20 ml aproximadamente en un vaso de precipitación, luego se las expone a la luz para que se concentren en un solo lugar y su recolección sea menos complicada; para lo cual se debe tener en consideración que se emplean alevines de apenas 24 horas de nacimiento. Para su recolección se utilizaron micropipetas de 5 a 20 u. teniendo en cuenta halla un mínimo de 10 organismos por vaso de precipitación.
- Para el traspaso de los peces empleando las micropipetas, se pipeteaban no siempre el mismo número de veces, ya que en varias ocasiones la cantidad de organismos en la pipeta no era siempre igual; por lo que se debía contar tanto el número de ml de la solución como de los peces para que al final se obtengan los 500 ml y la cantidad de la especie necesaria.
- Una vez que todos los vasos de precipitación se encuentren con sus respectivas concentraciones y con la mínima cantidad de 10 peces, se observa el movimiento de ellos. Para comprobar que todas los *Poecilia reticulata* se encuentren vivos.
- Se dejan en un tiempo de 24 horas en un ambiente con la mayor asepsia posible.

- Al término de las 24 horas se realiza el conteo de los alevines de la *Poecilia reticulata* que sobrevivieron en cada vaso de precipitación, con diferentes concentraciones incluido la placa control, haciéndolo para cada réplica, registrándose el número de peces guppy muertos. Los peces son considerados muertos sí no presentan movimiento después de 10 segundos de observación y con efectos subletales si presentan movimientos leves problemas al nadar.
- Si se existe la posibilidad, se debe realizar la observación con la ayuda de un microscopio para observar la diferencia en el movimiento de un pez guppy sin exposición al químico y otro expuesto a la sustancia tóxica.

Se debe tener en consideración que las concentraciones ensayadas de las muestras examinadas diluidas en agua dulce deben tener las mismas características para cada réplica y concentración. Los 9 ml de solución de prueba es colocada dentro de un vaso de precipitación. Las muestras son analizadas en 2 a 3 réplicas.

El ensayo se realiza sin aireación y sin alimentación. La temperatura de la solución debe estar en un rango de 25 a 28 °C. El ensayo, por lo tanto, es enfocado en la mortalidad de la *Poecilia reticulata* versus la concentración del tóxico en el tiempo.

7.2. Metodología de los análisis estadísticos

7.2.1. Método Probit

Para el calcular la CL_{50} por medio del método Probit, se necesita enumerar, aunque sea dos porcentajes intermedios del efecto que se espera, es decir entre 0 y 100%.

Luego de obtener los resultados en los ensayos de toxicidad aguda con *Poecilia reticulata* hay que desarrollar una tabla en el la cual se incluyan ciertos datos:

- Concentración de la sustancia ensayada en %.
- Cantidad mortalidad de los organismos por concentración (r).
- Cantidad de organismos en cada concentración.
- Porcentaje de organismos fallecidos en cada concentración (P).

En una nueva tabla se deben obtener los siguientes datos:

Se obtiene el logaritmo a partir de la concentración de la sustancia usada en el ensayo, el cual se basa en diez (10) de las concentraciones (x), para después utilizar el

porcentaje de mortalidad en forma decimal del valor numérico, con lo que se obtendrá la distribución normal estándar individual o la probabilidad de cada resultado, a lo que se ingresan 5 unidades para determinar el número Probit.

En el gráfico que se observa en el eje de las abscisas se coloca el número del logaritmo de la concentración en base diez, y el eje de las ordenadas incluye el resultado del número Probit, de donde se saca un gráfico lineal, y usando la regresión lineal se tendrá la ecuación de la recta, con lo cual se tendrán los valores de intercepción y la pendiente, dichos valores nos servirán para el reemplazo en la ecuación:

$$y = ax + b$$

Con los valores de a y b, y ya que Probit 50 es $y = 5$, una vez la ecuación al despejar x quedará así:

$$\log x = \frac{5 - b}{a}$$

Quedando finamente en función de potencia 10 el resultado obtenido en el paso anterior.

Todos estos cálculos se facilitaron empleando el programa Microsoft Excel, y de manera mucho más fácil y exacta se empleó también el software que brinda la *US Environmental Protection Agency* o US EPA, que es el *Probit Analisis Program*, en el cual solamente se ingresan los datos acumulados de peces guppy expuestos y muertos a cada concentración utilizada.

7.2.2. Método de estimación gráfica

En este método también se utilizan los resultados que se obtienen durante el desarrollo de la investigación, para lo cual se elabora una tabla con los ciertas pautas a considerar: dicromato de potasio preparado en distintas concentraciones durante el bioensayo (0,050; 0,125; 0,250, 0,500 y 1,0ppm), incluyendo el grupo de control, además de la cantidad de peces guppys expuestos a cada una de las concentraciones, después la cantidad de lebistes sobrevivientes que quedan al culminar el ensayo de cada concentración y por lo tanto el valor de los peces muertos; con los resultados se calcula el porcentaje de mortalidad en cada una de las concentraciones.

Para poder desarrollar el gráfico que va a indicar el valor de la CL_{50} que se busca, se deben usar los valores que resultaron de las distintas concentraciones con sus

respectivos porcentajes de mortalidad. Realizado gráfico el valor de CL_{50} , va a corresponder al que corte la curva graficada, justo cuando el eje de del porcentaje de mortalidad señale el 50%.

En realidad este método no tiene mucha precisión, ya que el resultado final va a depender del valor que mejor crea el analista, debido a que solo se puede ya observar en la gráfica, pero no expresado como indicador matemático; a pesar de esto, se lo emplea como complemento comparativo para determinar qué tan real es el resultado final.

7.2.3. Análisis de la varianza Anova con Statgraphics

El análisis de la varianza es un procedimiento que permite descomponer la variabilidad de un experimento en variables independientes que puedan asignarse a causas distintas. El análisis de la varianza permite determinar si la media de la variable cambia en diferentes niveles de cada factor experimental.

El programa *Statgraphics*, ANOVA, permite realizar el análisis de los datos de un experimento con un factor. Los datos han de estar en dos columnas. En una de ellas estarán los valores de la variable respuesta, y en la otra, valores numéricos que representen a los niveles del factor. El valor numérico que se elija para representar los niveles del factor es irrelevante, basta con que sean distintos.

Para hacer el análisis de la varianza nos situamos en *Compare/Analisys of Variance/One-Way Anova* donde la entrada de datos es:

- Depent variable: variable respuesta donde aparecen los datos.
- Factor: se introduce la variable que contiene el código del nivel del factor. Esta variable debe contener un código para cada punto en la variable respuesta. Códigos iguales corresponden al mismo nivel del factor. El orden es irrelevante.
- Seleccionando el ícono de *Tabular Opciones* se cuenta con las siguientes opciones:
- *Analisys Summary*: proporciona información de la variable dependiente y del factor, así como de número de observaciones.
- *Summary Statistics*: hace un resumen de las propiedades estadísticas de la variable.
- *ANOVA table*: es una tabla que presenta los valores de variabilidad entre y dentro de los grupos. La suma de cuadrados dentro de los grupos mide la variabilidad dentro de cada grupo de factor. La suma de cuadrados totales mide la variabilidad de todos los datos con respecto a una medida.

- *Table of Means*: esta tabla muestra el número de observaciones en cada etiqueta, las medias, errores estándar, y límites superior e inferior de los valores de las medias. Pulsando el botón derecho del ratón (*Pane opciones*) puede modificarse el criterio para la construcción de estos límites.
- *Multiple Range Tests*: esta opción realiza contrastes múltiples. Esta sección es de interés, en general, sólo si el contraste ANOVA ha resultado significativo. La parte superior de la tabla muestra el número de observaciones y la media para cada grupo del factor. La parte inferior de la tabla hace el contraste de la diferencia de las medias. Las diferentes significativas (medias significativamente diferentes) vienen marcadas por un *. Se puede cambiar el método de contraste usado, pulsando el botón derecho, en *Pane opciones*.

7.3. Recursos utilizados

7.3.1. Recursos humanos

- Investigadora.
- Director de tesis.
- Revisor.
- Docentes de la Carrera de Ingeniería Química.

7.3.2. Recursos operativos

Materiales

- Embudo.
- Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Frascos ámbar.
- Matraz aforado de 500 y 1000 ml.
- Micropipetas desechables.
- Papel aluminio.
- Papel filtro.
- Papel pH.
- Pipetas serológicas de 5 y 10 ml.

- Porta y cubreobjetos.
- Probetas graduadas de 50 y 100 ml.
- Vasos de precipitación de 500 y 1000 ml.
- Viales con tapadera de rosca.
- Termómetro.

Equipos

- Balanza analítica digital.
- Bomba dosificadora de aire para acuarios 20HP.
- Potenciómetro ATC.

Sustancias y reactivos

- Modelo biológico: alevines de *Poecilia reticulata*.
- Tóxico de referencia: Dicromato de potasio 99.9% de pureza.
- Agua destilada.
- Agua dulce.

Recursos financieros

- Análisis de ensayos.
- Implementación de equipos de laboratorio.
- Textos de Toxicología, Química, Ecoturismo y Acuicultura.
- Internet.
- Impresión de tesis.
- Copias de documentos.
- Consultas de asesoramiento.
- Transporte.
- Alimentación.
- Sustentación.
- Varios.

8. Recolección de los Datos

8.1. Ecotoxicología, descripción del pez guppy y dicromato de potasio

Para poder estandarizar el protocolo para la evaluación ecotoxicológica de agua dulce mediante la determinación de la CL_{50} de Dicromato de Potasio en pez guppy (*Poecilia reticulata*), se hizo primero una revisión bibliográfica sobre la información existente.

De acuerdo a la información recopilada los alevines de la especie *Poecilia reticulata* que se adquirieron para los ensayos tenían una edad menor de 24 horas, los cuales fueron ubicados en distintas peceras de vidrio con una aireación y alimentación *ad libitum*.

Dentro de los parámetros ecotoxicológicos que se llevaron a cabo fueron físico – químicos y biológicos, el cual fue empleado en la concentración letal media (CL_{50}) la cual señala la concentración (en este caso dilución de la muestra) que ocasiona la mortalidad del 50% de la población expuesta al contaminante.

Por el análisis que se realizó a los cromatos y dicromatos (cromo VI), vertidos como producto de la actividad de diferentes sectores industriales, se determinó la toxicidad aguda del dicromato de potasio en alevines de la especie *Poecilia reticulata* como método alternativo aplicado a la ecotoxicología. En este método se expusieron alevines de 24 h a diferentes concentraciones del compuesto y se determina la CL_{50} correspondiente, así como los efectos adversos que puedan ocasionar. Estas pruebas ecotoxicológicas permiten predecir la toxicidad del dicromato de potasio en corto plazo ya que es una metodología que combina simplicidad, rapidez, confiabilidad y bajo costo.

Las descargas industriales representan un impacto ambiental negativo lo cual desencadena diversos efectos nocivos en especial a los ecosistemas acuáticos. Y a su vez la toxicidad del dicromato en los ecosistemas acuáticos está condicionada de forma importante por el grado de bioasimilación y por los mecanismos de defensa que esgriman los organismos frente a los metales.

Dentro de esta descripción puedo afirmar que mediante el ensayo realizado se logró estandarizar un procedimiento ecotoxicológico para evaluar al pez guppy mediante ensayos ecotoxicológicos.

8.2. Parámetros y procedimientos para la evaluación ecotoxicológica

Los peces utilizados para los ensayos se adquirieron de forma comercial con una edad menor a 24 horas pero estos se lo mantenía en el laboratorio en un período de cuarentena, durante esos 40 días fueron alimentados una vez al día de forma consecutiva en relación a su alimentación *ad libitum*.

Los peces que se compraron de forma comercial llegaron hembras, machos, e incluso en período de gestación. Una vez adquiridos y clasificados se los procedió a ubicar en peceras diferentes para evitar que se haga reproducción. Las hembras fecundadas, fueron cuidadosamente separadas y colocadas en redes incubadoras, con un sistema de cultivo cerrado con recirculación del agua, una vez paridas las hembras, se procedió a exponer los alevines guppy (< 24 h) al tóxico de referencia (dicromato de potasio) para realizar los ensayos ecotoxicológicos.

8.2.1. Soluciones

Las soluciones para las pruebas de toxicidad fueron preparadas con agua dulce, además de la solución madre del tóxico de referencia la cual fue preparada con agua destilada y el dicromato de potasio.

Los ensayos se realizaron con cinco concentraciones distintas (0,050; 0,125; 0,250, 0,500 y 1,0), expresadas en partes por millón (ppm) de la sustancia toxica y otra de control por triplicado obteniendo el test definitivo.

Las soluciones se prepararon al momento en el cual iban a ser usados unos minutos antes de realizar los ensayos de toxicidad, las soluciones se prepararon bajo temperatura ambiente revisando la temperatura del agua, para evitar la mortandad de los organismos a prueba debido al cambio de temperatura de la misma.

Para realizar las pruebas de toxicidad con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), se preparó una solución madre a 1 ppm, a partir de esta solución madre se hizo una secuencia del 50% hasta obtener todas las muestras necesarias; luego de lo cual se

dosificó cada una de las concentraciones obtenidas de la solución madre de acuerdo a los parámetros establecidos para las pruebas.

Una vez calculado los gramos necesarios para tal concentración, se pesó 1 mg de $K_2Cr_2O_7$, con ayuda de una balanza analítica digital. Después de pesar se diluyó en un matraz de 1000 ml, en 500 ml de agua destilada. Se dejó reposar un momento para luego proceder a hacer las diferentes diluciones con variadas concentraciones traspasando el 50% de su contenido a un matraz otro matraz de 1000 ml luego se completaba hasta los 500 ml con agua destilada, y así se trabajó con las demás dosis.

8.2.2. Dosis

Las dosis fueron establecidas en la ley tomando el mínimo y el máximo mediante dentro de ese rango se estableció una serie de dosis.

Tabla 8.1
Dosis de las soluciones

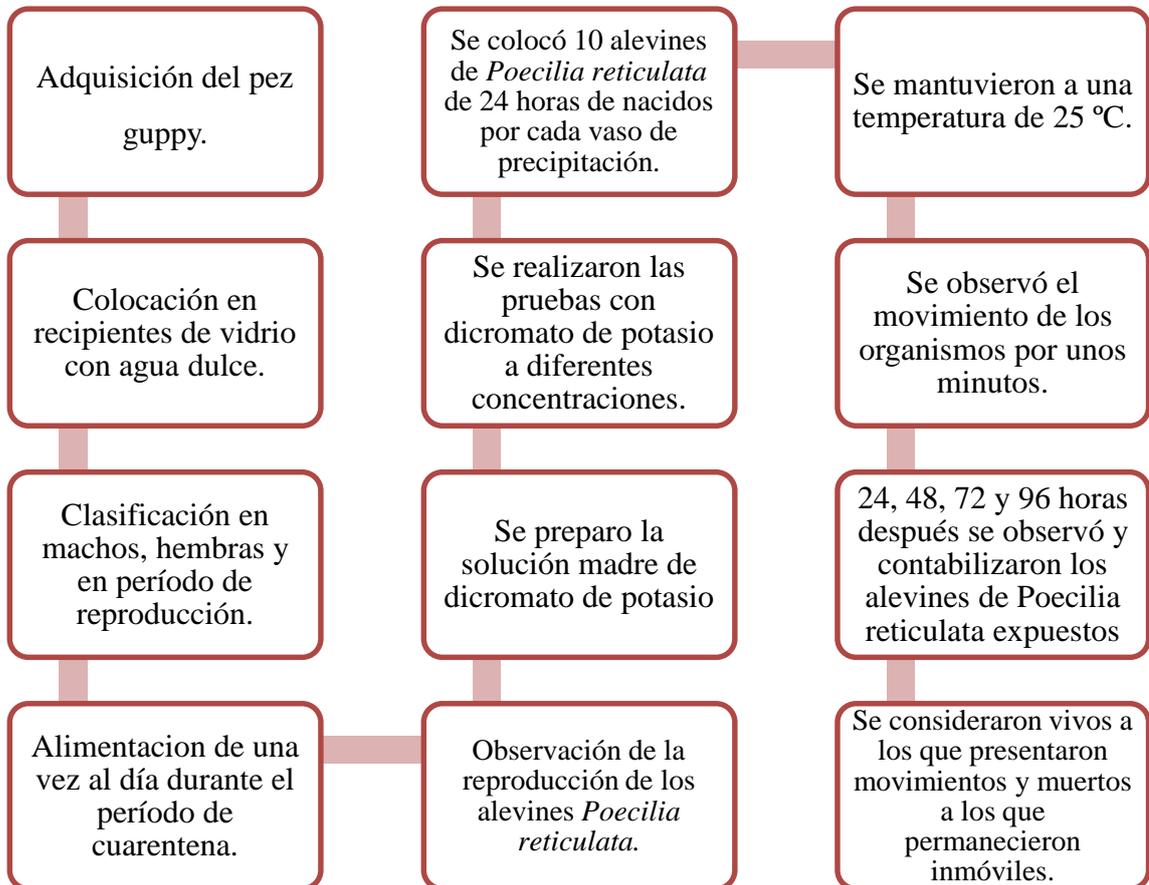
	DOSIS	%
Máximo	1 mg/lt	200 %
	0,5 mg/lt	100 %
	0,25 mg/lt	75%
	0,125 mg/lt	50 %
Mínimo	0,05 mg/lt	25 %
Control	0	0 %

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

8.2.3. Experimento

Figura 8.1

Diagrama del proceso experimental del bioensayo



Fuente: Autora del Trabajo de Titulación
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

8.3. Exposición del pez guppy a diferentes concentraciones de dicromato de potasio para estandarizar su Cl_{50}

Se expuso al pez guppy, manteniéndolo durante 7 días en las concentraciones de dicromato de potasio ya establecidas, todas estas concentraciones fueron preparadas a partir de una solución de dicromato de potasio al 99% en agua destilada con concentración de 1 ppm, empleando un grupo control el cual contiene sola sustancia o medio de reproducción que en este caso es el agua dulce, la cual no debe presentar una considerable mortalidad puesto que si la existiese se podría suponer que la causa del

deceso de los alevines de pez guppy se debe a la contaminación del medio en el que se reprodujo.

Se debe recalcar que cada 24 horas se evaluó mortalidad o efectos subletales y se realizaron revisiones diarias durante los 7 días. En las siguientes fotos se muestran parte del material, sustancias organismo evaluados en la prueba:

Figura 8.2
Bioensayo de ecotoxicidad



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

En la imagen anterior, se observa el procedimiento para el ensayo de toxicidad aguda en pez guppy, sometido a las siguientes concentraciones: 1 mg/lit, 0,5 mg/lit, 0,25 mg/lit, 0,05 mg/lit y el grupo control al 0%, los peces fueron colocados en vasos de precipitación de 2000 ml, la temperatura ambiente del laboratorio fue de 25 °C.

Figura 8.3
Bioensayo de ecotoxicidad



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

En la Figura 8.3 se aprecian los vasos de precipitación que fueron llenados hasta los 500 ml con agua destilada, y en los cuales se colocaron los peces guppy en número de diez por recipiente, esperando que progrese el experimento.

Figura 8.4
Bioensayo de ecotoxicidad 24 horas

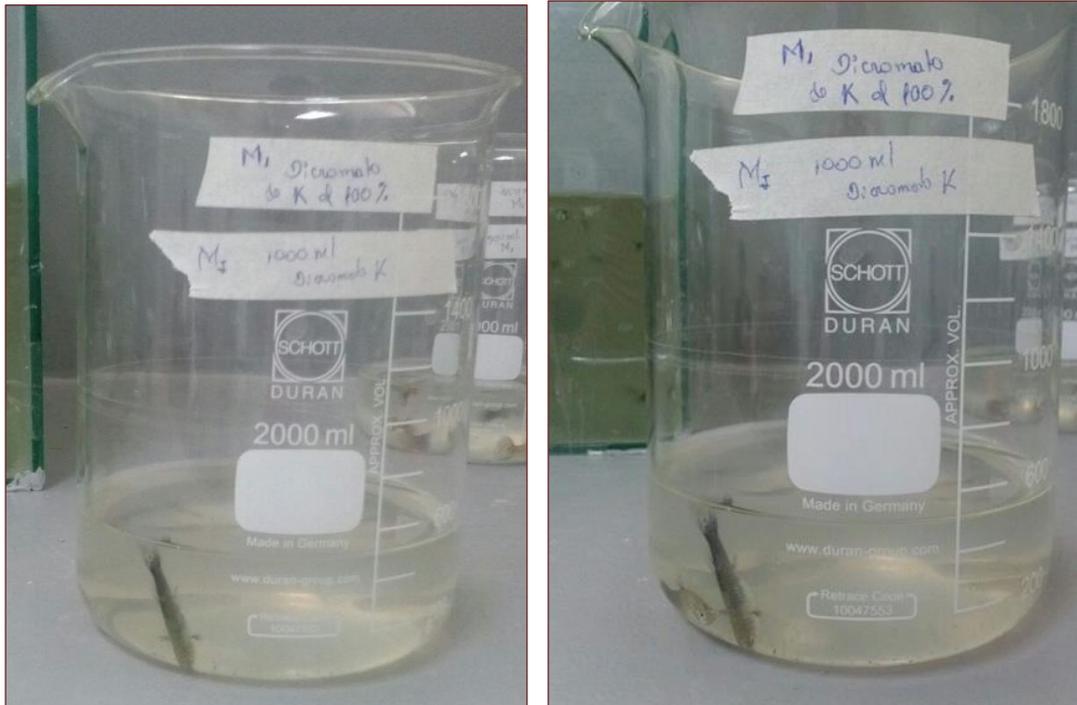


Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

En la figura anterior, se puede observar, los vasos de precipitación con sus respectivas concentraciones y en ellas los organismos de prueba (peces guppy), los cuales aún se encuentran en condiciones estables, sin pérdida de movimiento ni ninguna otra alteración.

Figuras 8.5 – 8.6

Bioensayo de ecotoxicidad 48 horas

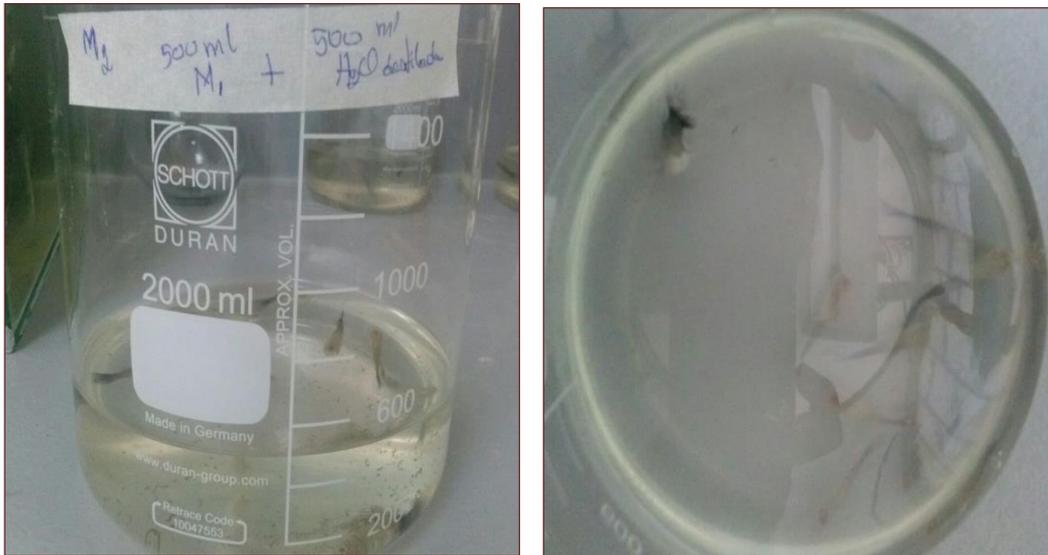


Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

En las figuras 8.5 y 8.6, se aprecian dos vasos de precipitación en los cuales se ha colocado la sustancia patrón para el experimento, es decir, el dicromato de potasio, y además se puede distinguir que los alevines del organismo escogido ya comienzan a presentar algo de dificultad para nadar normalmente.

Figuras 8.7 – 8.8

Bioensayo de ecotoxicidad 72 horas



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

En las figuras 8.7 y 8.8 se aprecian los peces guppy en uno de los vasos de precipitación, pero en este caso, no se observan todavía efectos subletales en los mismos.

Figura 8.9

Bioensayo de ecotoxicidad 96 horas.



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

En la imagen anterior, se encuentran los peces guppy, ya avanzado el procedimiento, por lo que presentan en esta etapa efectos subletales importantes, como falta de movimiento y capacidad de reacción, algunos ya no pueden nadar.

Figura 8.10 – 8.11

Bioensayo de ecotoxicidad final – efectos subletales



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Las figuras 8.10 y 8.11, presentan a los organismos estudiados ya fallecidos, los cuales llegan a la superficie ya sin movimientos y sin signos de vida, lo que demuestra que el desarrollo del bioensayo ecotoxicológico ha llegado a su fin con los resultados esperados.

En la siguiente tabla se explican todos los valores obtenidos de la exposición de los peces. La tabla expresa las dosis de las concentraciones con las que se trabajó, el número de peces que se expusieron a cada concentración y el número de peces muertos el cual se representa en porcentaje de mortalidad.

Tabla 8.2**Exposición de *Poecilia reticulata* a diferentes concentraciones**

Dicromato Pez Guppy			
Dosis	Muertos	Expuestos	
ppm			% de mortalidad
-	0	10	0,0
0,050	1	10	10,0
0,125	2	10	20,0
0,250	4	10	40,0
0,500	4	10	40,0
1,000	5	10	50,0

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*

Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Durante el ensayo realizado y mediante la tabla expuesta se determinó que a diferentes dosis se presentó mortalidad de los peces expuestos con excepción del grupo control. Estos resultados pueden ser en partes explicados por la gran efectividad del cromo como dicromato en la bioacumulación que se lleva a cabo lentamente y que con el pasar del tiempo esta dosis se va convirtiendo en letales hasta causar daños considerables. Sin embargo, cabe resaltar que es necesario ser muy cuidadosos con la interpretación de los resultados obtenidos de los ensayos, ya que no pueden generalizarse a otros modelos animales incluyendo el hombre y no representan los efectos sub-letales y crónicos que pueden generar los contaminantes.

9. Análisis de los Datos

Los datos correspondientes a la concentración letal media del dicromato de potasio sobre alevines del pez guppy expuestos durante 7 días, son presentados en los siguientes numerales y tablas, empleando diversos métodos estadísticos para establecer la dosis-respuesta.

9.1. Evaluación estadística por el método Probit

Mediante el método estadístico Probit con los datos recolectados sobre los alevines vivos, y muertos, a cada concentración durante el ensayo ecotoxicológico, se obtuvieron diferentes tablas el cual el gráfico necesario para determinar la concentración letal media para esta sustancia.

Tabla 9.1
Exposición de *Poecilia reticulata* a diferentes concentraciones

Dicromato-Pez Guppy			
Dose	Muertos	Expuestos	
ppm			% de mortalidad
-	0	10	0,0
0,050	1	10	10,0
0,125	2	10	20,0
0,250	4	10	40,0
0,500	4	10	40,0
1,000	5	10	50,0

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Durante el ensayo realizado y mediante la tabla expuesta se determinó que a diferentes dosis se presentó mortalidad de los peces expuestos con excepción del grupo control. Estos resultados pueden ser en parte explicados por la gran efectividad del cromo como dicromato en la bioacumulación que se lleva a cabo lentamente y que con el pasar del tiempo esta dosis se va convirtiendo en letales hasta causar daños considerables. Sin embargo, cabe resaltar que es necesario ser muy cuidadosos con la

interpretación de los resultados obtenidos de los ensayos, ya que no pueden generalizarse a otros modelos animales incluyendo el hombre y no representan los efectos sub-letales y crónicos que pueden generar los contaminantes.

Además la tabla describe que en relación de las dosis hubo un número de muertos por cada uno de los grupos y de los expuestos.

- En el grupo 1, que es el grupo control no hubo ningún muerto a todos los peces expuestos, lógicamente porque solo era el agua lo que representa un 0%.
- En el grupo 2 a una dosis de 0,05 ppm de dicromato de potasio, al final del análisis se determinó que existía un animal muerto de los 10 expuestos lo que representa un porcentaje de mortalidad del 10%.
- En el grupo 3 a una dosis de 0,125 ppm de dicromato de potasio, al final del análisis se determinó que existía 2 animales muertos de los 10 expuestos lo que representa un porcentaje del 20%.
- En el grupo 4 a una dosis de 0,25 ppm de dicromato de potasio, al final del análisis se determinó que existía 4 animales muertos de los 10 expuestos lo que representa un porcentaje del 40%.
- En el grupo 5 a una dosis de 0,50 ppm de dicromato de potasio, al final del análisis se determinó que existía 4 animales muertos de los 10 expuestos lo que representa un porcentaje del 40%.
- En el grupo 6 a una dosis de 1,00 ppm de dicromato de potasio, al final del análisis se determinó que existía 5 animales muertos de los 10 expuestos lo que representa un porcentaje del 50%.

9.2. Verificación de los resultados

Para tabular y expresar los resultados se utilizó un modelo de regresión lineal-Probit, que evalúa en primer lugar un porcentaje de la dosis en relación a la solución a evaluar, la dosis ya establecida es muy difícil llevarla a un porcentaje ya que daría valores muy bajos porque incluso hay concentraciones inferiores a las ya establecidas como 0,001, y como esos valores pueden dar valores negativos al momento de establecer los valores logarítmicos, por tal razón es que se lleva a un valor porcentual de dosis como se muestra en la tabla la concentración 0 es 0, pero la concentración 1,00

vendría a ser el 100% de la dosis evaluada y así se lo divide en un valor porcentual que lo identifique.

Como están definidos en valor porcentual este se lo determina en relación a la mínima y a la máxima se establece el 0 y el 100%, este valor porcentual se lo lleva a un valor logarítmico, en el Probit se utilizan valores logarítmicos porque con el logaritmo los valores se ajustan, esto quiere decir que cuando en los valores hay rangos muy amplios entre uno y otro hay mucho riesgo de que existan posibles aumentos de los valores de errores estándar, por tal razón que cuando uno lo llevo a valores logarítmicos lo que se hace es disminuir el error para que se ajusten las curvas, esto quiere decir que se forman valores más definidos para una recta.

La dosis en ppm se la lleva a un valor porcentual porque si no se la lleva va a dar valores muy bajos y puede salir valores negativos y lo que se evitan es que los valores salgan negativos porque los valores logarítmicos negativos no se pueden llevar a un gráfico.

Tabla 9.2
Resultados mediante el método Probit

Dosis mg.	Dose %	log dose	% responding	Decimal	Normsinv	Probit
-	0	0,00	0,0	0		
0,050	20	1,30	10,0	0,100	1,28155157	3,72
0,125	40	1,60	20,0	0,200	0,84162123	4,16
0,250	60	1,78	40,0	0,400	-0,2533471	4,75
0,500	80	1,90	40,0	0,400	-0,2533471	4,75
1,000	100	2,00	50,0	0,990	2,32634787	7,33
Media	0,321					

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

En la tabla 9.2, se aprecia que los valores llevados a modelo Probit, se lo hace para obtener tres valores: el logaritmo de la dosis, el valor de la respuesta de la mortalidad y un valor de la regresión, se hace estas tres evaluaciones porque es una forma de asegurarse de que tan distantes están las curvas en relación a la dosis, porque una es la Probit la forma más lejana que tiene de expresarse los resultados de mortalidad en este modelo y la otra es la regresión que es el ajuste de la curva.

Tabla 9.3

Resultados mediante el método Probit

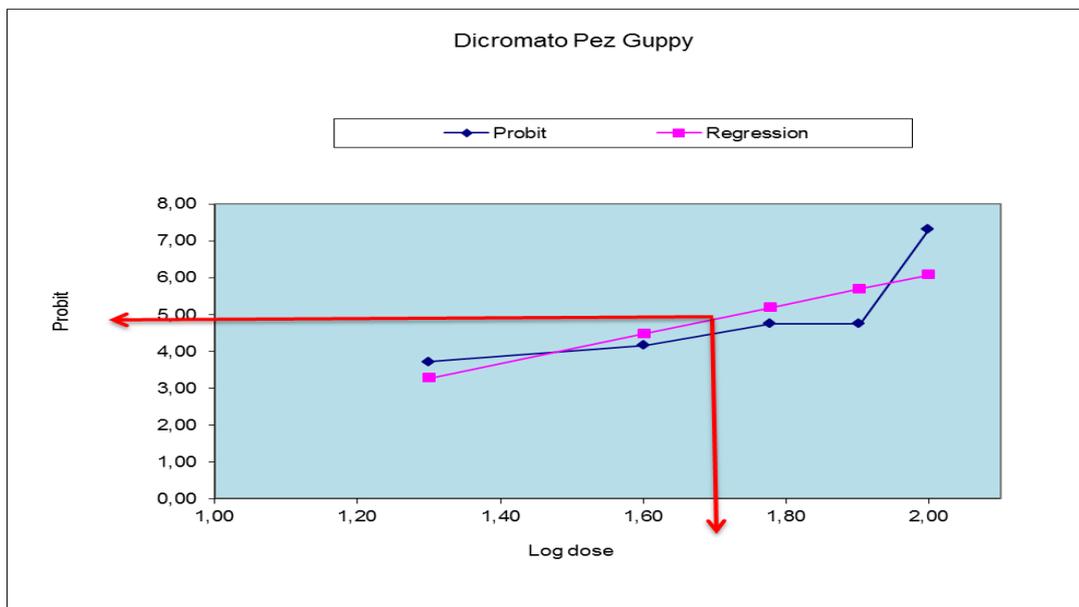
For Plotting		
log dose	Probit	regression
1,30	3,72	3,27
1,60	4,16	4,48
1,78	4,75	5,19
1,90	4,75	5,69
2,00	7,33	6,08

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
 Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

La tabla anterior se resumen los valores para el desarrollo del grafico que manifieste el modelo de regresión lineal, de esta manera los valores utilizados como variable independiente corresponden a los valores del log dose (logaritmo de la dosis), y la variable dependiente, serían los valores expresados de mortalidad en números Probit y los valores de predichos para el ajuste de la regresión estimada.

Gráfico 9.1

Estimación gráfica de resultados mediante el modelo Probit



Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
 Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

El gráfico 9.1 representa el modelo Probit y su relación con el logaritmo de la dosis y el resultado de la regresión. La línea azul, nos muestra la curva del progreso del resultado Probit que parte de un valor menor a 4,00 (3,72), y llega casi a 8,00 (7,33); la curva que representa al valor de la regresión, que es de color fucsia, parte desde un poco más de 3,00 (3,27) y llega a un valor mayor de 6,00, es decir, 6,08. El valor del logaritmo de la dosis se encuentra en la parte inferior del gráfico, y el valor de Probit y la regresión, se expresa en la variable (y).

Es necesario llevar los datos obtenidos al modelo Probit, con la finalidad de ajustar las concentraciones de las dosis y su relación con el porcentaje de mortalidad en número Probit.

Como se observa en el gráfico 9.1 el valor de cl50 por estimación grafica se obtiene trazando unas líneas verticales y horizontales que describan los valores estimados para la cl50. Las cuales se aprecian en el gráfico mencionado.

9.2.1. Concentración letal 50 (CL₅₀)

Representa la mitad de la muerte de las especies en un estudio. Se puede ser más exacto en la concentración de las dosis, lo que se busca que no exista mucho error entre el cálculo de una dosis y otra y para calcular la CL₅₀ que es donde se encuentra el 50% de los peces muertos.

Tabla 9.4
Concentración letal media del Bioensayo

slope	4,02	logLD50=	1,732	log dose
y intercept	-1,97	LD50=	53,946	doses %
			0,346	ppm

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

La CL₅₀ es 53,946 de la dosis, por tal razón es que se lleva la dosis a un porcentaje, la cual se encuentra estaría 1,732 lo que correspondería en la ppm de dicromato a 0,346 ppm de dicromato. Esto quiere decir que a esta concentración de 0,346 ppm de dicromato o superior a este tenemos la probabilidad que todos los animales de un experimento se mueran. Porque al llegar a la CL₅₀ quiere decir que se murieron la mitad de las especies tratadas, pero al llegar a la CL₅₁ puede que se mueran

todas porque no necesariamente el modelo es progresivo la muerte no va a ser progresiva.

Si después en una agua que tiene compuesto de cromo hexavalentes donde las ppm sean superior a 0,346 todas las especies que estén en este rango de concentración corren el riesgo de que la mitad se mueran y al morirse la mitad de una especie en análisis ambientales en como que se mueran todas.

9.2.2. Evaluación estadística de la regresión

Para contar con análisis estadísticos más exactos, se realizó una verificación de los datos mediante el análisis automático de Microsoft Excel, el cual evidencio los mismos valores para las funciones de la regresión lineal, acorde a lo expresado por el software Statgraphics.

Tabla 9.5
Estadísticas de la regresión

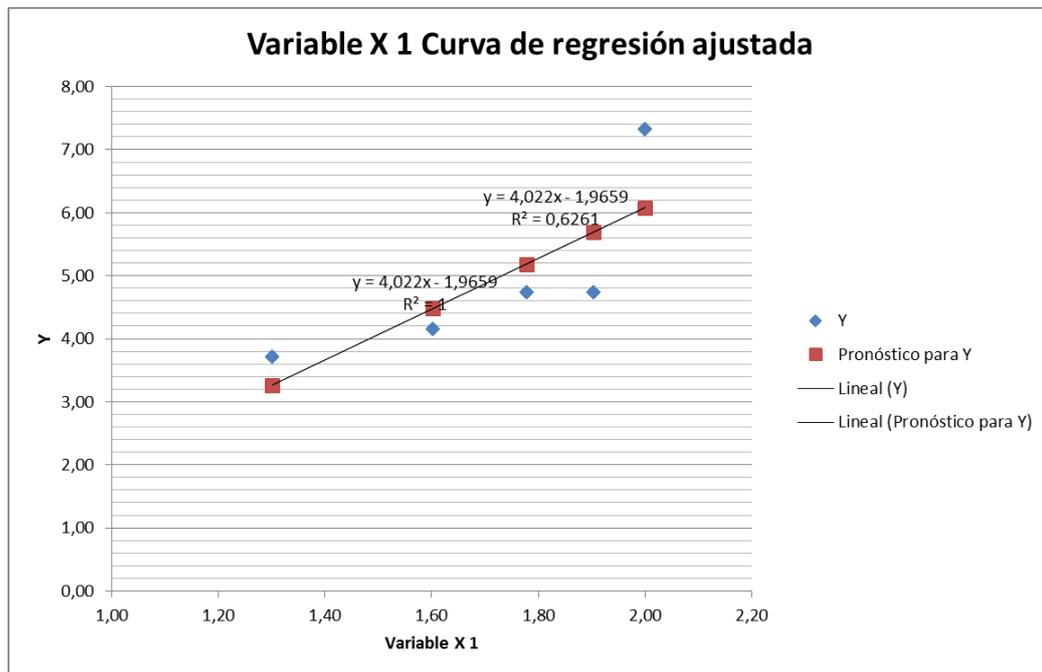
Coeficiente de correlación múltiple	1
Coeficiente de determinación R^2	1
R^2 ajustado	1
Error típico	1,81299E-16
Observaciones	5

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Como se aprecia en la tabla anterior, los valores de coeficiente de correlación múltiple para los datos evaluados, se ajustan hacia 1 en todos los ensayos realizados, así como también el coeficiente de determinación R^2 y el R^2 ajustado en este caso fue de 1. Esto manifiesta la correlación de las variables cumpliendo con los supuestos del análisis de regresión que deben describir normalidad, independencia y homocedasticidad para los datos evaluados.

Gráfico 9.2

Curva de la regresión ajustada



Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

9.2.3. Análisis de la varianza

El análisis de la variabilidad nos ayuda a descomponer los valores provenientes de la comparación de las medias muestrales entre los grupos evaluados, de tal manera que se puede describir la diferencia estadísticamente significativa para los datos obtenidos de los ensayos. De tal manera que en base a los datos se realizó el análisis estadístico de la variabilidad ANOVA.

De los resultados expresados en la tabla 9.6, se puede describir un valor crítico de F de $1,20 \times 10^{-48}$, lo cual infiere que no existen diferencias estadísticamente significativas para los grupos evaluados, de tal manera que los valores utilizados para dicho análisis si concuerdan con los datos paramétricos y continuos, que manifiestan correlaciones entre las variables, no causales, dando un mecanismo de comprobación de la hipótesis alternativa al aceptar que si se correlacionan las concentraciones utilizadas de dicromato de potasio con el porcentaje de la mortalidad expresada en el modelo biológico del pez guppy.

Tabla 9.6
Análisis de Varianza

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	4,92895313	4,928953133	1,49957E+32	1,2009E-48
Residuos	3	9,8608E-32	3,28692E-32		
Total	4	4,92895313			
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	
Intercepción	-1,965923422	5,6969E-16	-3,45087E+15	5,36644E-47	
Variable X 1	4,021990424	3,2844E-16	1,22457E+16	1,20094E-48	
	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>	
Intercepción	-1,96592342	-1,96592342	-1,965923422	-1,965923422	
Variable X 1	4,02199042	4,021990424	4,021990424	4,021990424	

Fuente: Bioensayo Ecotoxicológico de *Poecilia reticulata*
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Los errores típicos son valores muy bajos, que no implican la utilización de otro método estadístico para su comprobación futura, de tal manera que comprueban la correlación de las variables, bajo otros tipos de probabilidad como la t de Student. Igualmente se calculan los valores límites para cada una de los factores de la función de ajuste.

9.3. Equipos, materiales y reactivos

Los equipos, materiales, sustancias y reactivos que se utilizaron para desarrollar la presente investigación sobre la evaluación ecotoxicológica de agua dulce mediante ensayos en pez guppy, son los siguientes:

9.3.1. Materiales

- Embudo.
- Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Envases de color ámbar.
- Matraz aforado de 500 y 1000 ml.
- Micropipetas desechables.

- Papel de aluminio.
- Papel para filtro.
- Papel para pH.
- Pipetas serológicas de 5 y 10 ml.
- Peras para succión.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Probetas con graduación de 50 y 100 ml.
- Vasos de precipitación de 500 y 1000 ml.
- Viales con tapa de rosca.
- Termómetro.

9.3.2. Equipos

- Balanza analítica digital.
- Bomba dosificadora de aire para acuarios 20HP.
- Potenciómetro ATC.

9.3.3. Sustancias y reactivos

- Tóxico de referencia: Dicromato de potasio con 99.9% de pureza.
- Agua destilada.
- Agua dulce.

10. Elaboración del Reporte de los Resultados

10.1. Discusión

En los últimos años, en varios países, se ha concientizado sobre la importancia de estudios que valoren la peligrosidad que puede generar el vertimiento de compuestos tóxicos en las aguas residuales, especialmente provenientes de la industria; pese a ello, se han desarrollado muy pocas investigaciones sobre este tema, dado los altos costos de ciertos químicos contaminantes, la falta de técnicas para evaluar las sustancias y asimismo el poco desarrollo de métodos estandarizados existentes para este tipo de estudios.

En este mismo sentido, entre las especies más utilizadas para este caso, se encuentran los peces como por ejemplo la *Poecilia reticulata*, por pertenecer y ubicarse en un nivel importante de la cadena alimenticia, y siendo un vertebrado cuyo entorno de desarrollo es el medio acuático, representa un organismo que brinda resultados importantes en el momento de realizar una prueba biológica.

Uno de los parámetros más usados para este tipo de estudios es la determinación de la concentración letal media «CL₅₀», y entre las sustancias nocivas que pueden provocar ecotoxicidad tenemos al dicromato de potasio, el cual fue el tóxico de referencia escogido en la presente investigación.

No se encontró información precisa sobre estudios ecotoxicológicas similares al presente trabajo y mucho menos en nuestro país, en los que se haya utilizado conjuntamente el CL₅₀, el dicromato de potasio y el pez guppy, sin embargo, existen algunos estudios publicados y documentados en los cuales se los mencionan como parte de sus investigaciones.

En un estudio realizado en el Valle del Cauca, Colombia (2013), publicado por Barba-Ho, Ballesteros, Patiño y Ramírez Callejas con el fin de estimar el impacto generado por los vertimientos de la industria de curtiembres en corrientes superficiales, utilizaron dos organismos de prueba, el microcrustáceo *Daphnia pulex* el pez *Poecilia reticulata*; en este se monitoreó el vertimiento durante tres jornadas de 24 horas de duración cada una. En cada jornada se recolectaron 4 muestras compuestas de 6 horas cada una, resultantes de la sumatoria de las submuestras tomadas cada media hora

durante un periodo de 6 horas. Los máximos niveles de toxicidad (superiores a 100 UT) en el vertimiento de la curtiembre se presentaron principalmente en las muestras recolectadas durante las jornadas 1 (6:00 a.m. a 12:00 m.) y 4 (12:00 p.m. a 6:00 a.m.), periodos en los cuales regularmente se adelantan los procesos de curtido que utilizan sustancias tóxicas como cromo y sulfuro.

Silva y otros (2007), en su estudio publicado en Chile, sobre la toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando el dicromato de potasio como tóxico de referencia, concluyeron que la sensibilidad de la especie expresada como el promedio de la CL_{50-96 h} de 8 bioensayos consecutivos es 20,4 mg L⁻¹ con una desviación estándar de 3,3 mg L⁻¹, y el límite de vigilancia superior (LCS) e inferior (LCI) de la CL_{50-96 h} del K₂Cr₂O₇ es 27,0 y 17,1 mg L⁻¹, respectivamente.

Velandia Guauque y Montañez Cardozo (2010), determinaron en un estudio sobre bioensayos de toxicidad acuática utilizando *Daphnia pulex*, que la concentración letal media CL₅₀₋₄₈, del cromo hexavalente sobre esta especie era de 0.13 ppm, al igual que para el plomo se determinó que la CL₅₀₋₄₈ era de 0.43 ppm, las cuales se encontraban entre el límite inferior y el límite superior del análisis Probit demostrando de esta forma una confiabilidad del 95% en los resultados encontrados; al realizar un análisis comparativo de los valores hallados de la concentración letal media del cromo hexavalente (CL₅₀₋₄₈= 0.13 mg/L) y la concentración letal media del dicromato de potasio (CL₅₀= 0.22 mg/L), se concluyó que el cromo hexavalente es más tóxico cuando se encuentra en estado puro, que cuando se encuentra haciendo parte de un compuesto como es el dicromato de potasio.

Los estudios antes citados, no fueron realizados en nuestro país, y no son iguales al presente trabajo, pero son un ejemplo de la importancia del tema presentado, y por la misma razón, que no existen muchos estudios que den información sobre la ecotoxicidad, queda claro, que esta investigación constituye una importante fuente de información local, nacional y mundial, dejando un aporte científico-académico de gran valor para el futuro, ya que se logró desarrollar un protocolo estandarizado que será imprescindible en distintas investigaciones venideras.

Por lo tanto lo antes citado nos indica que la especie *Diplodon chilensise* es extremadamente resistente a altas concentración de cromo hexavalente en aguas residuales ya que según el estudio realizado en Chile concluyeron que el valor expresado con el promedio de la CL_{50} es 20,4 mg L⁻¹, mientras que el *Daphnia pulex*, presenta sensibilidad a dichas aguas contaminadas con cromo hexavalente porque según el estudio presenta valores muy bajos e incluso inferiores al límite permisible según la ley y por ultimo según el análisis realizado en esta tesis nos indican que los alevines *Poecilia reticulata*, son especies resistentes a altas concentraciones de cromo hexavalente ya que se obtuvo un valor de 1,73 mg L⁻¹ según su CL_{50} , valor superior según lo permisible a la ley que es de 0,5 mg L⁻¹.

Además se ha llegado a establecer que, concentraciones de cromo a partir de 1.0 mg/l tiene efectos letales en peces, moluscos y crustáceos pueden llegar a acumular concentraciones de hasta 400 veces por encima de niveles permisibles; esto puede causar envenenamiento agudo en aquellos animales o seres humanos que los utilizan como alimento.

10.2. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos a través del ensayo químico-ambiental, para la determinación de la CL₅₀ de dicromato de potasio en el pez guppy, en el laboratorio de ecotoxicología la Universidad Técnica de Manabí, se concluye que:

Los parámetros y procedimientos utilizados en el ensayo ecotoxicológico mediante la exposición a diferentes concentraciones de dicromato de potasio como sustancia patrón tóxica de referencia para determinar la concentración letal media (CL₅₀) y la toxicidad aguda de los peces *Poecilia reticulata* en agua dulce, nos permite cumplir el objetivo planteado ya que se ha mostrado que el pez guppy es una especie de confiabilidad para la determinación de concentraciones altas de cromo hexavalente en diferentes aguas residuales.

Todos los peces expuestos a diferentes concentraciones preparadas con dicromato de potasio presentaron mortalidad a partir del 10%; siendo el grupo de 1,0 ppm el que presentó el mayor porcentaje de mortalidad con el 50%; lo que quiere decir que a mayor concentración, es mayor el riesgo de muerte de los organismos perjudicados. Entonces la dosis-respuesta fue del 100% de letalidad a una concentración de solución de 1,0 ppm de dicromato de potasio, puesto que el CL₅₀, mide el 50% de toxicidad de la especie en un medio circundante.

Se desarrolló en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, la implementación de equipos y materiales necesarios, conjuntamente con la estandarización de un protocolo de evaluación ecotoxicológica en agua dulce en peces de la especie *Poecilia reticulata* (pez guppy), que se podrá poner en práctica para el análisis de aguas residuales industrializadas en nuestro medio, y que servirá para futuras investigaciones de importancia científico-académica.

10.3. Recomendaciones

En base a las conclusiones realizadas se recomienda lo siguiente:

Con el apoyo del Gobierno Nacional conjuntamente con el Ministerio de Industrias y Productividad, realizar programas de capacitación dirigidos estudiantes y egresados de nivel académico superior y profesionales en ciencias químicas y biológicas mediante charlas y seminarios científico-académicos para acrecentar los conocimientos en cuanto estas ramas de las ciencias poco desarrolladas en nuestro medio; asimismo apoyar para la planificación e implementación de centros de investigación que faciliten las investigaciones.

A la Universidad Técnica de Manabí, en especial a la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas y la Escuela de Ingeniería Química, a través de sus autoridades y docentes, promover el desarrollo protocolos para diferente tipos de investigaciones químicas de poco conocimiento pero de mucha utilidad en nuestra localidad, debidamente fundamentadas.

A los estudiantes universitarios de la Escuela de Ingeniería Química, procedentes de cualquier universidad de la provincia de Manabí o de cualquier otra región; usen la presente investigación como un instrumento certificado para el desarrollo de cualquier investigación que tenga relación con el tema y la problemática planteada, como recurso referencial importante.

A cualquier investigador o individuo, la presente investigación es un material debidamente desarrollado, con todos los parámetros que estipulan los reglamentos y normas postuladas internacionalmente, el cual queda a disposición como protocolo para la determinación de la concentración de la letalidad media (CL50) y toxicidad aguda del dicromato de potasio en los peces de la especie *Poecilia reticulata* en agua dulce como medio de circundante; por lo que se recomienda para cualquier desarrollar cualquier estudio de este tipo.

Presupuesto

Tema

“ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO ECOTOXICOLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN QUÍMICO - AMBIENTAL DE AGUA DULCE MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀ DE DICROMATO DE POTASIO EN PEZ GUPPY (*POECILIA RETICULATA*). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ, 2015”

Entidad

Universidad Técnica De Manabí.

Postulante

Fuentes Mastarreno Gabriela Elizabeth.

ÍTEM	DESCRIPCIÓN	TOTAL
1	Adquisición de materiales	\$2250
2	Adquisición y recolección de muestras e insumos	\$350
3	Internet	\$150
4	Copias	\$50
5	Transporte	\$100
6	Alimentación	\$100
7	Impresión de Tesis	\$150
8	Sustentación	\$100
9	Gastos Varios	\$250
TOTAL		\$ 3500

Son: TRES MIL QUINIENTOS DOLARES AMERICANOS.

Referencias Bibliográficas

- Acosta Santamaría, Carlos Joel, edit. 2012. “Análisis de la materia prima AMAP-01: Manual de prácticas de laboratorio”. [〈http://issuu.com/mewe44/docs/material_did_ctico_001〉](http://issuu.com/mewe44/docs/material_did_ctico_001).
- Alcívar Bazurto, Martha Cecilia y León Macías, Marina Yrene. 2011. *Monitoreo aleatorio de parámetros físicos y químicos en el afluente y efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Portoviejo*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Manabí, Sede Ecuador, Portoviejo).
- Álvarez Cruz, Francisco y Proaño Jiménez, David. 2006. “Implementación de un sistema de tratamiento de aguas residuales para una empresa metal – mecánica”. (Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil, Sede Ecuador). [〈http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/707/1/970.pdf〉](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/707/1/970.pdf).
- Angulo, Marta. 2014. “Fauna ibérica (peces): Pez guppy”, 11 de octubre. [〈http://www.mejoreslistasyrankings.com/otros/lista-fauna-iberica-peces-66413/10〉](http://www.mejoreslistasyrankings.com/otros/lista-fauna-iberica-peces-66413/10).
- Badii, Mohammad y Garza Almanza, Victoriano. 2005. “Monitoreo biológico como herramienta esencial en la evaluación del riesgo ecológico y el impacto ambiental”. *Cultura Científica y Tecnológica* 2, No. 7: 17-26. [〈http://openjournal.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/584/563〉](http://openjournal.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/584/563).
- Barba-Ho, Luz Edith, Ballesteros, Yojana V., Patiño, Paola J. y Ramírez Callejas, Carlos. 2013. “Impacto generado por los vertimientos de las curtiembres en corrientes superficiales usando pruebas de toxicidad”. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, No. 12: 79-90. [〈http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231130851008〉](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231130851008).
- Barros Santiago, Carmen Patricia y Gámez Rojas, Vilmar Enrique. 2008. “Determinación de la concentración letal media (Cl₅₀₋₉₆) del glifosato roundup^f 747_{sg}, por medio de bioensayos utilizando alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)”. (Tesis de pregrado, Universidad de la Salle, Sede Bogotá). [〈http://www.mamacoca.org/docs_de_base/Fumigas/Barros_y_Gamez_Concentracion_glifosato_UdeLaSalle_dic2008.pdf〉](http://www.mamacoca.org/docs_de_base/Fumigas/Barros_y_Gamez_Concentracion_glifosato_UdeLaSalle_dic2008.pdf).

- Capó Martí, Miguel Andrés. 2007. *Principios de ecotoxicología: Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*. España: Editorial Tebar.
- CVC (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca) y Universidad del Valle. 2007. “Evaluación de la presencia de Sustancias Tóxicas en algunos afluentes del río Cauca: Tramo Salvajina – La Virginia”, No. 4. <http://www.cvc.gov.co/cvc/Mosaic/dpdf3/volumen4/3-metodologiav4f3.pdf>.
- Docsetools. 2015. “Dicromato de potasio”. Consulta: 27 de abril. http://docsetools.com/articulos-para-saber-mas/article_41174.html.
- Gold-Bouchot, Gerardo y Zapata-Pérez, Omar. 2004. “Contaminación, ecotoxicología y manejo Costero”. En Evelia Rivera Arriaga, Guillermo Villalobos Zapata, Isaac Azuz Adeath y Francisco Rosado May, edit., *El manejo costero en México: 277-286*. México: Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad, Universidad de Quintana Roo. <http://etzna.uacam.mx/epomex/pdf/mancos/cap18.pdf>.
- Herkovits, Jorge y Pérez-Coll, Cristina. 2006. “Ecotoxicología. Su importancia para la protección del medio ambiente, la salud humana y la comprensión del proceso evolutivo”. Argentina: Instituto de Ciencias Ambientales y Salud (ICAS), Fundación Prosama. <http://www.itaes.org.ar/biblioteca/Ecotoxicologia.pdf>.
- International Programme on Chemical Safety* y Comisión Europea. 2005. “Fichas internacionales de seguridad química: dicromato de potasio”. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1301a1400/nspn1371.pdf>.
- La Hora. 2007. “Contaminación sigue galopante”, 19 de agosto. http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/608054/-1/Contaminaci%C3%B3n_sigue_galopante.html#.VUv1BY5_NHw.
- Martínez Cartajena, Andrea Soledad. 2013. “Validación de métodos analíticos por espectrofotometría para determinar sulfatos, cianuros y cromo hexavalente en aguas, suelos y lixiviados”. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador, Quito). <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/890/1/T-UCE-0017-25.pdf>.
- Martínez-Jerónimo, Fernando, Rodríguez-Estrada, Jesús y Martínez-Jerónimo, Laura. 2008. “*Daphnia exilis* Herrick, 1895 (Crustácea: Cladocera): Una especie

- zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales”. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 24, No. 4: 153-159. <<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/article/view/21617>>.
- Merck. 2014. “Ficha de datos de seguridad”. <http://www.merck-performance-materials.com/merck-ppf/detailRequest?unit=CHEM&owner=MDA&productNo=104862&language=ES&country=CO&docType=MSD&source=GDS&docId=/mda/chemicals/msds/es-CO/104862_SDS_CO_ES.PDF>.
- Miliarium. 2015. “Índices de toxicidad”. Consulta: 24 de abril. <<http://www.miliarium.com/prontuario/indices/IndicesToxicidad.htm>>
- Pérez, César. 2015. “Peces de acuario tropicales: Alimentación, hábitat y reproducción del guppy”. Consulta: 20 de abril: <<http://es.calameo.com/books/003457966e2292bb8add5>>
- Ramírez Romero, Patricia y Mendoza Cantú, Ania, comp. 2008. “Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México”. México, D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). <<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/573.pdf>>.
- Rozas Riquelme, Pablo Andrés. 2008. “Estudio de Adsorción para Cr (VI) utilizando chacay (*ulexeuropaeus*) como carbón activo cubierto con quitosan”. (Tesis de pregrado, Universidad de los Lagos, Sede Chile, Puerto Montt). <<http://www.monografias.com/trabajos75/estudio-adsorcion-cr-carbon-cubierto-quitosan/estudio-adsorcion-cr-carbon-cubierto-quitosan3.shtml>>.
- Silva, Jeannette, Fuentealba, Carmen, Bay-Schmith, Enrique y Larraín, Alberto. 2007. “Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un toxico de referencia”. *Gayana*, 71, No. 2: 135-141. <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-65382007000200001&script=sci_arttext>.
- Sistema de Información Marino Costera del Ecuador «SIMCE». 2015. “Diseño de un programa de monitoreo de las descargas de aguas residuales industriales en la franja costera”.

⟨<http://simce.ambiente.gob.ec/sites/default/files/documentos/belen/Informe%20Final%20Descargas%20aguas%20residuales.pdf>⟩.

- Sobrero, María Cecilia. 2010. “Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnóstico”. (Tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Sede Argentina, La Plata).
⟨<http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/5246/all-0001.pdf%3Fsequence%3D1>⟩.
- Vaca Álvarez, Lenin Stalin. 2012. “Elaboración del manual para el adecuado manejo de residuos químicos peligrosos en la Facultad de Ciencias Químicas”. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador, Sede Ecuador, Quito).
⟨<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/830>⟩.
- Velandia Guauque, Lina María y Montañez Cardozo, Yanny Sirley. 2010. “Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del plomo y cromo hexavalente mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando *Daphnia pulex*”. (Tesis de pregrado, Universidad de la Salle, Sede Colombia, Bogotá).
⟨<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14910/T41.10%20V54d.pdf?sequence=1>⟩.
- Vivapets. 2015. “Guppy: Pez para principiantes”. Consulta: 17 de abril.
⟨<http://www.vivapets.es/raza/guppy/108>⟩
- Wikispaces. 2011. “Efectos de la temperatura en la proporción sexual de la especie *Poecilia reticulata*”.
⟨<http://guppys.wikispaces.com/>⟩.

Anexos

Anexo 1

Ficha internacional de seguridad del dicromato de potasio

DICROMATO DE POTASIO			ICSC: 1371 Abril 2005
CAS: 7778-50-9 RTECS: HX7680000 NU: 3288 CE Índice Anexo I: 024-002-00-6 CE / EINECS: 231-906-6	Dicromato (VI) de dipotasio Sal de dipotasio del ácido dicrómico Bicromato potásico $K_2Cr_2O_7$ Masa molecular: 294.2		
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	No combustible pero facilita la combustión de otras sustancias.	NO poner en contacto con sustancias inflamables.	En caso de incendio en el entorno: agua en grandes cantidades.
EXPLOSIÓN	Riesgo de incendio y explosión en contacto con sustancias combustibles.		
EXPOSICIÓN		¡EVITAR LA DISPERSIÓN DEL POLVO! ¡EVITAR TODO CONTACTO!	¡CONSULTAR AL MÉDICO EN TODOS LOS CASOS!
Inhalación	Sensación de quemazón. Dolor de garganta. Tos. Sibilancia. Dificultad respiratoria.	Sistema cerrado y ventilación.	Aire limpio, reposo. Posición de semiincorporado. Respiración artificial si estuviera indicada. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Enrojecimiento. Dolor. Quemaduras cutáneas.	Guantes de protección. Traje de protección.	Aclarar con agua abundante, después quitar la ropa contaminada y aclarar de nuevo. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor. Visión borrosa. Quemaduras profundas graves.	Pantalla facial o protección ocular combinada con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Náuseas. Vómitos. Dolor abdominal. Sensación de quemazón. Diarrea. Shock o colapso.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Dar a beber uno o dos vasos de agua. Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
Protección personal adicional: traje de protección completo incluyendo equipo autónomo de respiración. Barrer la sustancia derramada e introducirla en un recipiente no combustible; si fuera necesario, humedecer el polvo para evitar su dispersión. Recoger cuidadosamente el residuo, trasladarlo a continuación a un lugar seguro. NO absorber en serrín u otros absorbentes combustibles. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente.		No transportar con alimentos y piensos. Clasificación UE Símbolo: T+, N, O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61 Nota: E, 3 Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 6.1 Grupo de Envasado NU: III	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
Ficha de Emergencia de Transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-61GT5-III		Separado de sustancias combustibles y reductoras, alimentos y piensos. Almacenar en un área sin acceso a desagües o alcantarillas.	
Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © CE, IPCS, 2005			
IPCS International Programme on Chemical Safety			

Fuente: *International Programme on Chemical Safety* y Comisión Europea
 Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 2

Ficha internacional de seguridad del dicromato de potasio

DICROMATO DE POTASIO		ICSC: 1371
DATOS IMPORTANTES		
<p>ESTADO FÍSICO; ASPECTO Cristales de naranja a rojos.</p> <p>PELIGROS QUÍMICOS La sustancia es un oxidante fuerte y reacciona con materiales combustibles y reductores. La disolución en agua es un ácido débil.</p> <p>LÍMITES DE EXPOSICIÓN TLV: (como Cr) 0.05 mg/m³ como TWA; A1 (cancerígeno humano confirmado); BEI establecido (ACGIH 2005). MAK: (Fracción inhalable); H (absorción dérmica); Sh (sensibilización cutánea); Cancerígeno: categoría 1; Mutágeno: categoría 2; BAR establecido (DFG 2009).</p>	<p>VÍAS DE EXPOSICIÓN La sustancia se puede absorber por inhalación del aerosol, a través de la piel y por ingestión.</p> <p>RIESGO DE INHALACIÓN Puede alcanzarse rápidamente una concentración nociva de partículas suspendidas en el aire cuando se dispersa.</p> <p>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN La sustancia es corrosiva para los ojos, la piel y el tracto respiratorio. Corrosivo por ingestión. La sustancia puede afectar al riñón e hígado, dando lugar a lesiones de los tejidos.</p> <p>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA El contacto prolongado o repetido puede producir sensibilización de la piel. La exposición prolongada o repetida por inhalación puede originar asma. La sustancia puede afectar a tracto respiratorio y riñón, dando lugar a perforación en el tabique nasal y alteración renal. Esta sustancia es carcinógena para los seres humanos. Puede causar daño genético hereditario en células germinales humanas. La experimentación animal muestra que esta sustancia posiblemente cause efectos tóxicos en la reproducción humana.</p>	
PROPIEDADES FÍSICAS		
<p>Se descompone por debajo del punto de ebullición a 500°C Punto de fusión: 398°C Densidad: 2.7 g/cm³</p> <p>Solubilidad en agua, g/100 ml a 20°C: 12 (elevada)</p>		
DATOS AMBIENTALES		
La sustancia es muy tóxica para los organismos acuáticos. La sustancia puede causar efectos prolongados en el medio acuático.		
NOTAS		
Enjuagar la ropa contaminada con agua abundante (peligro de incendio). NO llevar a casa la ropa de trabajo. Nadie que haya mostrado síntomas de asma debe entrar nunca en contacto con esta sustancia. Los síntomas de asma no se ponen de manifiesto, a menudo, hasta pasadas algunas horas y se agravan por el esfuerzo físico. Reposo y vigilancia médica son, por ello, imprescindibles. Esta ficha ha sido parcialmente actualizada en abril de 2010: ver Límites de exposición, Ingestión-Primeros Auxilios.		
INFORMACIÓN ADICIONAL		
<p>Límites de exposición profesional (INSHT 2011):□□</p> <p>VLA-ED: (como Cromo) 0,05 mg/m³ □□</p> <p>C1B (Sustancia carcinogénica de categoría 1B); M1B (Sustancia mutagénica de categoría 1B).□□</p> <p>Notas: sensibilizante. Esta sustancia tiene establecidas restricciones a la fabricación, comercialización o al uso especificadas en el Reglamento REACH.</p>		
NOTA LEGAL	Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.	
© IPCS, CE 2005		

Fuente: *International Programme on Chemical Safety* y Comisión Europea

Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 3
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



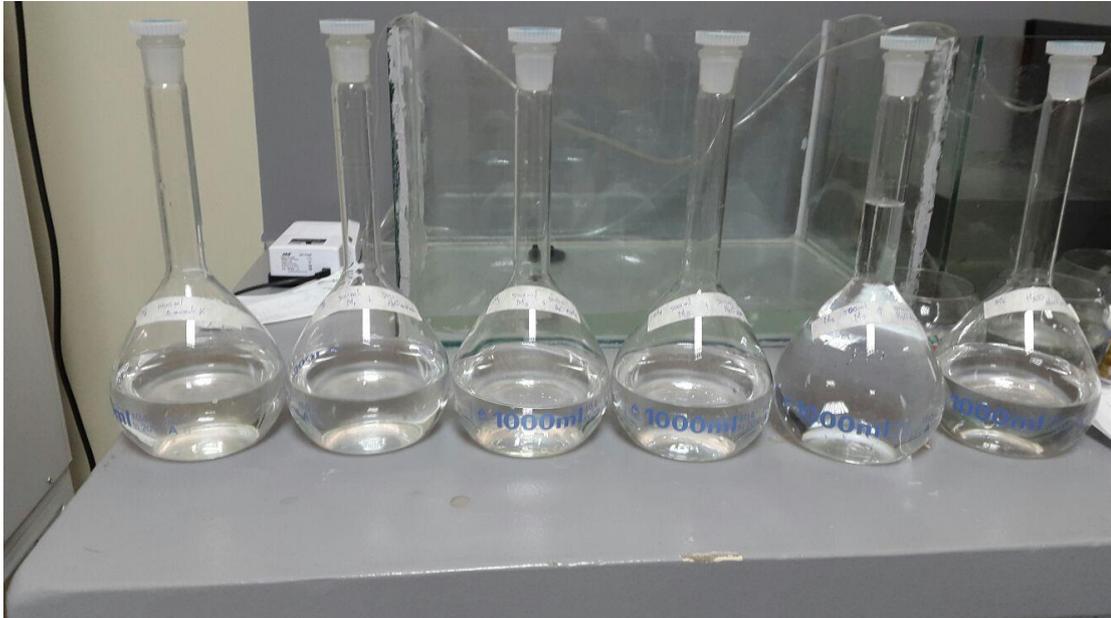
Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 4
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



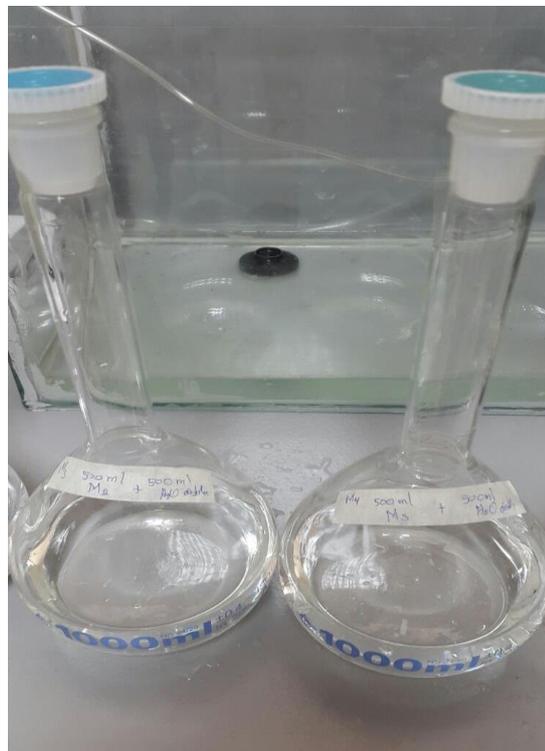
Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 5
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



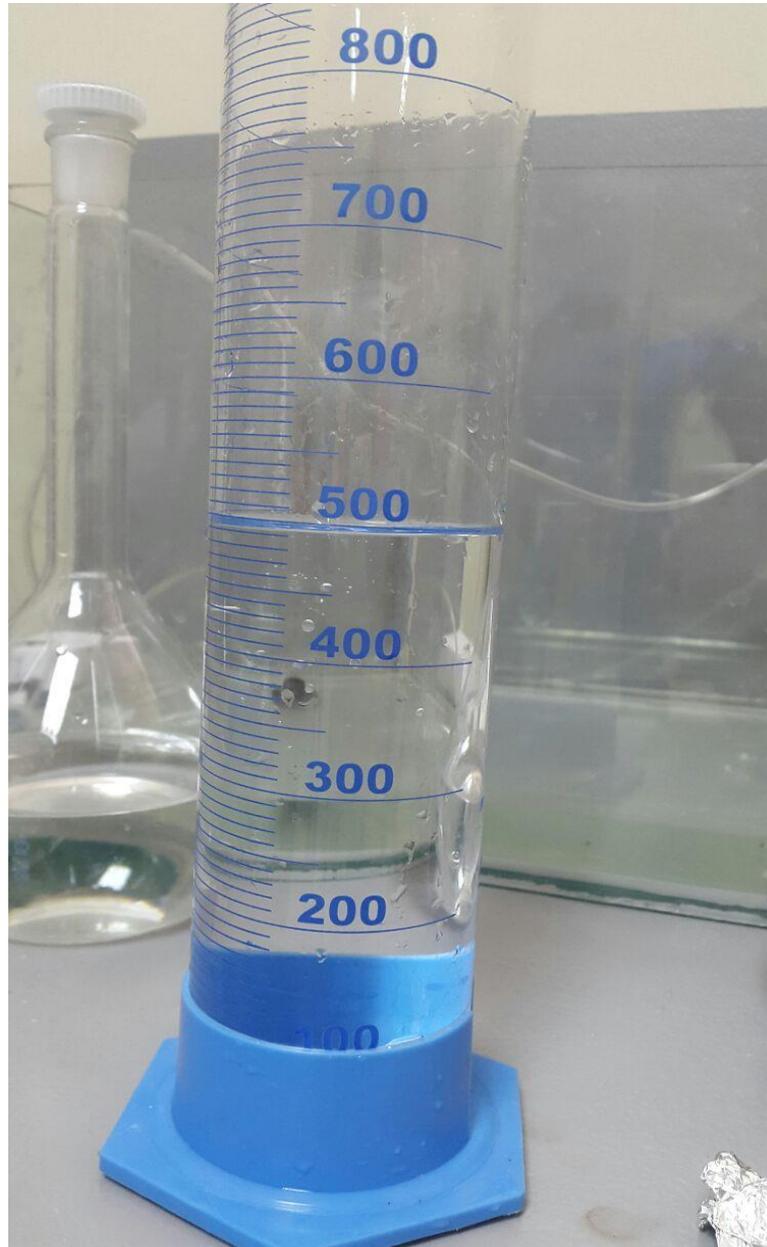
Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 6
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 7
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 8
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



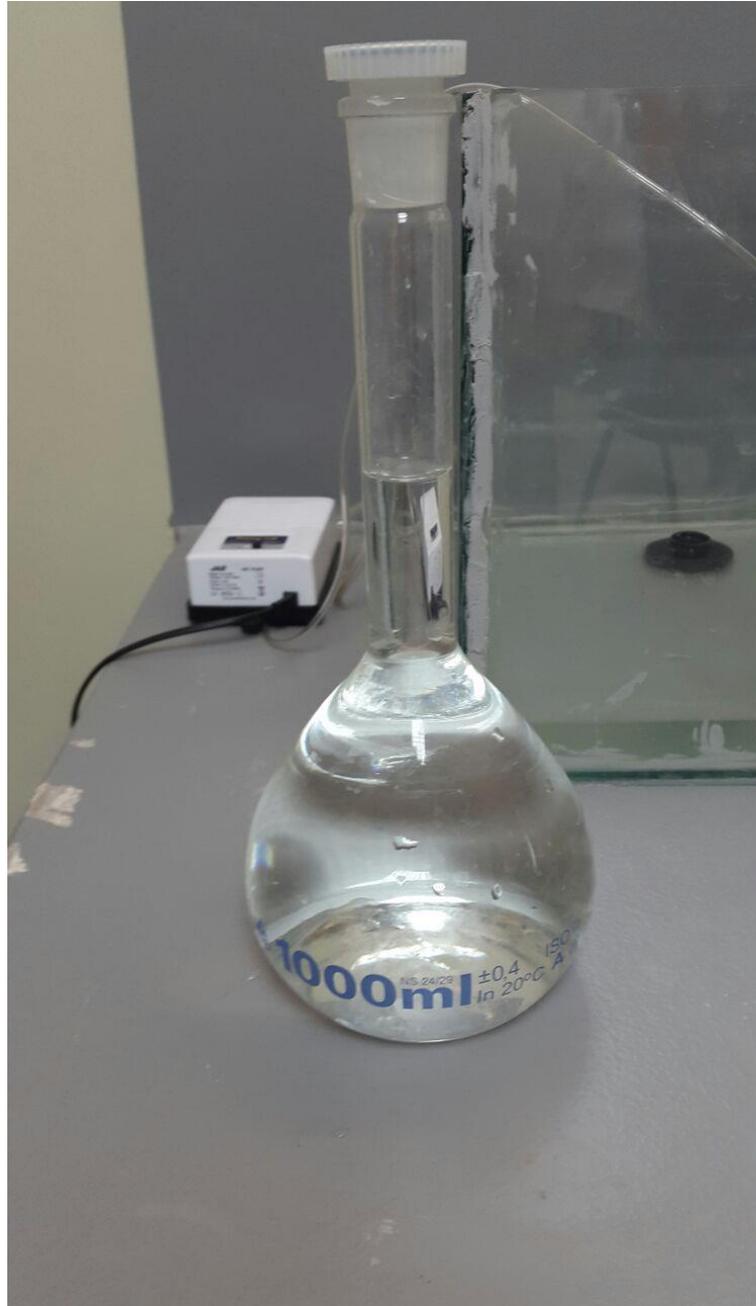
Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 9
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 10
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación

Anexo 11
Desarrollo del bioensayo ecotoxicológico



Fuente: Laboratorio de Ecotoxicología
Elaboración: Autora del Trabajo de Titulación