



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS MATEMÁTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS DE GRADO

Modalidad: Trabajo Comunitario

TEMA:

**“DETERMINACIÓN DE DICROMATO DE POTASIO COMO
PATRÓN EN ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE ARTEMIA
SALINA, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ 2013”**

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO QUÍMICO

AUTORES:

ALMEIDA ZAMBRANO JORGE ALFREDO

GARAY QUIROZ FULTON ROLANDO

QUIMIS CHIQUITO JOHANA LISSETTE

RIZZO PONCE JENNIFFER BELÉN

DIRECTOR DE TESIS:

Ing. Ulbio E. Alcívar Cedeño Mg. Sc

Portoviejo, Abril del 2014

DEDICATORIA

En mi primera instancia agradezco al Ser Supremo, que me protege durante todo mi camino y me da fuerzas para superar los obstáculos que se me presentan.

El presente trabajo de tesis va dedicado con mucho amor a mis padres, ya que me han sabido formar con los valores necesarios para ser una persona de bien.

A mis hermanas por brindarme siempre su incondicional apoyo, las adoro. Mis sinceros agradecimientos a los miembros de mi querida familia por darme el total apoyo y confianza para lograr mi objetivo, a Bete, MacGiver, Patista y Malavela.

A mi querida abuelita Natividad que la tengo en este mundo; a mis abuelitos que desde el cielo me guían y me cuidan, Ernesto, Felicidad y Florentino.

A mi amiga, mi compañera, mi novia, Jenn Belén, por haber estado conmigo en las buenas y en las malas desde el principio.

Y como no agradecer a mis compañeros y amigos que siempre me brindaron su contingente.

Jorge

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, él que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

De igual forma, dedico esta tesis a mi madre y a mi padre que han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

Agradezco también a mi abuelita que es como mi segunda madre ya que gracias a su sabiduría influyeron en mi la madurez para lograr todos los objetivos en la vida, es para usted está tesis en agradecimiento por todo su amor.

A tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para ti, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado.
REBECA.

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Rolando

DEDICATORIA

Dedicado a Dios en primer lugar por ser el ser único y omnipotente en la vida del ser humano.

A mi familia por ser mi gran apoyo

Johana

DEDICATORIA

El resultado de un trabajo duro y constante siempre llena de satisfacción el corazón de quienes nos quieren.

Como ser supremo y único, que no dejo que decayera en la desesperación en momentos difíciles, dedico el arduo trabajo realizado a Dios.

A los seres quienes desde siempre han sido mi gran apoyo y fortaleza, mostrando su confianza y amor indispensable para llegar a toda meta propuesta, y ahora que he subido un escalón más en mi vida profesional, dedico el logro obtenido en esta tesis a mis amados padres Ángel y Lucrecia, agradecida con ellos por todo lo dado.

Porque con risas y abrazos se sobresaltan todos los obstáculos, dedico este triunfo a mis hermanos por todas las muestras de apoyo brindadas.

Al resto de mi familia que con una frase de aliento y esperanza estuvieron apoyándome en el transcurso de mi carrera universitaria.

Y finalmente a mi propia persona, ya que nunca me rendí pese a las adversidades y me demostré que el sacrificio y perseverancia, brindan un dulce fruto llamado éxito.

Jennifer

AGRADECIMIENTO

“La gratitud y el reconocimiento van de la mano y son los mejores regalos que puede recibir una persona en cualquier época y lugar del mundo”.

Infinita gratitud a Dios porque sin él nada de esto hubiese podido realizarse.

A los directivos de la Universidad Técnica de Manabí, institución que nos permitieron poder cumplir con los estudios superiores.

Al director de carrera Ing. Francisco Sánchez por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis.

A los miembros del tribunal de revisión y evaluación, conformado por dignos docentes quienes con su criterio fueron una gran fuente de ayuda.

Al director de tesis Ing. Ulbio Alcívar por prestar sus conocimientos y experiencia en la ejecución de este trabajo de investigación, y llevarla a su culminación.

A la Ing. Virginia Sánchez por prestar las instalaciones del laboratorio de microbiología para la ejecución de los ensayos.

A los catedráticos y catedráticas por inducir los conocimientos de manera eficiente, en el día a día durante los años de estudios, los mismos que nos permitirán ejercer de manera adecuada nuestra profesión.

Y finalmente agradecemos a nuestras familias y amigos que siempre fueron de gran apoyo para cada momento no solo lo que duro este trabajo, sino quienes estuvieron en el transcurso de nuestra vida estudiantil.

LOS AUTORES

CERTIFICADO DE DIRECTOR DE TESIS

ING. ULBIO E. ALCIVAR CEDEÑO MG., CATEDRÁTICO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MATEMÁTICAS, FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ:

CERTIFICA:

QUE: los señores: ALMEIDA ZAMBRANO JORGE ALFREDO, GARAY QUIROZ FULTON ROLANDO, QUIMIS CHIQUITO JOHANA LISSET y RIZZO PONCE JENNIFFER BELÉN Egresados de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, han cumplido con las observaciones realizadas por los Honorables Miembros del tribunal Examinador, por lo que la presente investigación se encuentra concluida bajo los parámetros metodológicos de una tesis de grado, cuyo tema es: **“DETERMINACIÓN DE DICROMATO DE POTASIO COMO PATRÓN DE ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE ARTEMIA SALINA, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ 2013”**. La misma que se pone a consideración de la Autoridad Competente, para su validación previo a su defensa y sustentación.

.....

Ing. Ulbio E. Alcívar Cedeño Mg.

DIRECTOR DE TESIS

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS MATEMÁTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TEMA:

**“DETERMINACIÓN DE DICROMATO DE POTASIO COMO PATRÓN
DE ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE ARTEMIA SALINA,
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ 2013”**

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del tribunal de Revisión y Sustentación y Legalizada
por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título
de:

INGENIERO QUÍMICO

APROBADA POR EL TRIBUNAL

.....
Ing. Qco. Alexandra Córdova.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....
Ing. Qco. Virginia Sánchez Mendoza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Ing. Larry Castro Coello

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICADO DE AUTORÍA

Los Autores: Almeida Zambrano Jorge Alfredo, Garay Quiroz Fulton Rolando, Quimis Chiquito Johana Lissette y Rizzo Ponce Jenniffer Belén , egresados de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí

DECLARAMOS QUE:

Los resultados pensamientos, ideas, opiniones, interpretaciones, conclusiones y recomendaciones, así como la información obtenida en este trabajo de investigación, titulado “Determinación de Dicromato de Potasio como Patrón de Ensayos Ecotoxicológicos sobre Artemia Salina, Universidad Técnica de Manabí 2013”, son responsabilidad y pertenecen exclusivamente a los autores de la tesis.

Almeida Zambrano Jorge Alfredo

AUTOR DE TESIS

Garay Quiroz Fulton Rolando

AUTOR DE TESIS

Quimis Chiquito Johana Lissette

AUTOR DE TESIS

Rizzo Ponce Jenniffer Belén

AUTOR DE TESIS

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
DEDICATORIA	II
DEDICATORIA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
CERTIFICADO DE DIRECTOR DE TESIS	VI
APROBADA POR EL TRIBUNAL	VII
CERTIFICADO DE AUTORÍA	VIII
INDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	XVII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XVIII
ÍNDICE DE CUADROS	XIX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XX
RESUMEN	XXI
SUMARY	XXII
TEMA	23
1. LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO	24
1.1. MACRO-LOCALIZACIÓN	25
1.2. MICRO-LOCALIZACION	26
2. FUNDAMENTACIÓN	27
2.1. DIAGNÓSTICO DE LA POBLACIÓN	27

2.2. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	29
2.3. PRIORIZACIÓN DEL PROBLEMA	29
2.4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	30
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVOS	33
4.1. OBJETIVO GENERAL:	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
5. MARCO CONCEPTUAL	34
5.1. DEFINICIONES	34
5.2. MARCO LEGAL	38
5.2.1. CONSTITUCIÓN POLÍTICA DEL ECUADOR	38
5.2.2. LEY DE GESTIÓN AMBIENTAL	38
5.3. QUÍMICA AMBIENTAL	44
5.4. SUSTANCIAS PATRONES	45
5.5. AGENTES TÓXICOS QUE REPRESENTAN AMENAZAS A LARGO PLAZO	46
5.6. TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS EN AGUA	47
5.6.1. CROMO	52
5.6.2. DICROMATO DE POTASIO	59
5.7. ¿QUÉ ES LA ECOTOXICOLOGÍA?	66
5.7.1. ¿QUÉ TIPO DE EFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS PUEDEN MEDIRSE?	67
5.8. BIOMAGNIFICACIÓN	70
5.9. ¿QUÉ ES UN BIOMARCADOR?	71
5.10. BIOINDICADORES = INDICADORES BIOLÓGICOS	71

5.11. ¿QUÉ ES UN BIOENSAYO?	72
5.11.1. BIOENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS GENERALIDADES	73
5.11.2. TIPOS DE BIOENSAYO SEGÚN SU TÉCNICA	75
5.11.3. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS EN LOS BIOENSAYOS	76
5.11.4. SIGNIFICADO ECOLÓGICO DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO	77
5.12. MODELOS BIOLÓGICOS	79
5.12.1. ARTEMIA SALINA	80
5.12.2. LA ARTEMIA EN ENSAYOS BIOLÓGICOS	92
5.12.2.1 Descripción de los índices de vulnerabilidad de la Artemia Salina expuesta a diferentes concentraciones de dicromato de potasio	94
5.12.3. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS ENSAYOS	96
6. BENEFICIARIOS	104
6.1. BENEFICIARIOS DIRECTOS	104
6.2. BENEFICIARIOS INDIRECTOS	105
7. METODOLOGÍA	106
7.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	106
7.2. MÉTODOS	106
7.3. DISEÑO EXPERIMENTAL – METODOLOGÍA	108
7.4. ENSAYO	109
7.4.1. PROCEDIMIENTO DE ESTERILIZACIÓN	109
7.4.2. PREPARACIÓN DE AGUA DE DILUCIÓN Y MEDIO DE ECLOSIÓN DE LOS QUISTES	109
7.4.3. PREPARACIÓN DE LA SERIE DE DILUCIÓN DE LA SUSTANCIA (TÓXICO), LLENADO DE PLACAS	114
7.4.4. PRUEBAS DE TOXICIDAD	121

7.5. METODOLOGÍA DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	126
7.5.1. MÉTODO PROBIT	126
7.5.2. MÉTODO DE REED MUENCH	127
7.5.3. MÉTODO DE ESTIMACIÓN GRÁFICA	130
7.5.4. ANÁLISIS DE LA VARIANZA ANOVA CON STATGRAPHICS	131
8. RECURSOS UTILIZADOS	134
8.1. RECURSOS HUMANOS	134
8.2. RECURSOS OPERATIVOS	134
8.3. RECURSOS FINANCIEROS	136
9. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	137
9.1. DESCRIPCIÓN DEL POTENCIAL IMPACTO DE DICROMATOS (Cr2O7) ⁻² Y CROMATOS (CrO7) ⁻² AL ECOSISTEMA.	137
9.2. EXPOSICION A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DICROMATO DE POTASIO A LA ARTEMIA SALINA EMPLEADA COMO MODELO BIOLÓGICO ECOTOXICOLOGICO	139
9.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DEL DICROMATO DE POTASIO EN ARTEMIA SALINA Y LOS EFECTOS ADVERSOS	141
9.3.1. CÁLCULO DE LA CONCENTRACION LETAL MEDIA	141
9.3.1.1. Evaluación estadística por el método Probit	141
9.3.1.2. Evaluación estadística por el método Reed Muench	147
9.3.1.3. Evaluación estadística por el método estimación gráfica	153
9.3.2. EFECTOS ADVERSOS DE LA EXPOSICIÓN DE LA ARTEMIA SALINA A DICROMATO DE POTASIO	156
9.4. ANALISIS DE VARIANZA ANOVA CON STATAGRAPHIC	158
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	161

10.1. CONCLUSIONES	161
10.2. RECOMENDACIONES	164
11. SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD	167
11.1. SUSTENTABILIDAD	167
11.2. SOSTENIBILIDAD	168
PRESUPUESTO	169
CRONOGRAMA	171
BIBLIOGRAFÍA	172
ANEXOS	180

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla N°1 : Límites permisibles de Cromo y sus formas químicas encontrados en el recurso agua según los anexos del TULAS	42
Tabla N° 2 : Diferentes compuestos del Cromo considerados como “Productos Químicos Prohibidos” que se utilicen en el Ecuador:	43
Tabla N° 3: Algunos compuestos químicos nocivos para el hombre y el medio	45
Tabla N° 4: Ejemplos de compuestos tóxicos que aparecen a menudo en los desechos químicos	47
Tabla N° 5: Métodos de determinación de metales pesados en el agua por espectrofotometría	50
Tabla N° 6: Características generales del cromo.	52
Tabla N° 7: Ejemplos de biomarcadores, medidos a diferentes niveles biológicos	71
Tabla N° 8: Tipos de bioensayo	75
Tabla N° 9: Características de la Artemia salina	82
Tabla N° 10: Comparación de las recomendaciones dadas para selección de modelo biológico y el Genero Artemia	92
Tabla N° 11: Cl ₅₀ para diferentes sustancias	93
Tabla N° 12: Condiciones de ensayo con Artemia Salina	95
Tabla N° 13: Parámetros físicos de las disoluciones de agua salada.	110
Tabla N° 14: Valores promedio de la primera reproducción de nauplios vivos de Artemia salina observados	113
Tabla N° 15: Valores promedio de la segunda reproducción de nauplios vivos de Artemia salina observados	114
Tabla N° 16: Descripción de los efectos que causan los cromatos y dicromatos en el ecosistema.	137
Tabla N° 17: Número de Artemias salinas expuestas a diversos concentraciones de dicromato de potasio y los resultados finales	139
Tabla N° 18: Datos empleados en la hoja Excel con el sistema Probit	141

para cálculos	
Tabla N° 19: Determinación mediante cálculo de la hoja Excel para el numero Probit	142
Tabla N° 20: Datos sobre las condiciones que se establecen para el grafico encontrándose la LC ₅₀ por Método Probit	143
Tabla N° 21: Datos que se obtuvieron en el ensayo realizado con concentraciones de dicromato de potasio sobre Artemia salina	147
Tabla N° 22: Valores corregidos acumulados de los datos anteriores	148
Tabla N° 23: Modelo matemático del método de Reed Muench	149
Tabla N° 24: Cálculo del valor de la incógnita B	150
Tabla N° 25: Reemplazo de la ecuación del modelo matemático del método de Reed Muench	150
Tabla N° 26: Datos que se obtuvieron en el ensayo realizado con concentraciones de dicromato de potasio sobre Artemia salina	150
Tabla N° 27: Valores corregidos Sin Acumular	151
Tabla N° 28 : Modelo matemático del método de Reed Muench	152
Tabla N° 29: Cálculo del valor de la incógnita B	152
Tabla N° 30: Reemplazo de la ecuación del modelo matemático del método de Reed Muench	153
Tabla N° 31: Comparación de la Concentración letal media del Dicromato de Potasio por los diferentes métodos estadísticos	155
Tabla N° 32: Efectos adversos observados en la Artemia salina en cada una de las concentraciones de dicromato expuestas.	157
Tabla N° 33: ANOVA para CL50 por METODO	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Páginas
Figura N° 1: Mapa de la ciudad de Portoviejo	24
Figura N° 2: Ubicación de la Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas	25
Figura N° 3: Ubicación del Laboratorio de Química	26
Figura N° 4: Modelo atómico del cromo	53
Figura N° 5: Especies de cromo VI dependiendo del pH	54
Figura N° 6: Ciclo ambiental del cromo	57
Figura N° 7: Orden de respuesta al estrés contaminante	69
Figura N° 8: Mecanismo de transporte de un contaminante químico en el ambiente	78
Figura N° 9: Imágenes de la Artemia salina	80
Figura N° 10: Ciclo de vida de la Artemia salina	84
Figura N° 11: Artemia salina y sus partes	87
Figura N° 12: Ciclo de vida sexual de Artemia salina	90
Figura N° 13: Ciclo de vida asexual de Artemia salina	91
Figura N° 14: Ejemplo de una Tabla ANOVA	132

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Contenido	Páginas
Diagrama N° 1: Metodología del Diseño Experimental	108
Diagrama N° 2: Proceso de eclosión de los quistes de Artemia Salina	112
Diagrama N° 3: Síntesis del proceso de en los ensayos ecotoxicológicos realizadas	125

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Contenido	Páginas
Esquema N° 1: Preparación de solución madre de Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇).	116
Esquema N° 2: Solución de 5ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇).	118
Esquema N° 3: Solución de 10 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇).	119
Esquema N° 4: Solución de 15 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇).	120
Esquema N° 5: Solución de 20 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇).	121
Esquema N° 6: Representación del ensayo por cada concentración y cada replica.	122

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro N° 1: Datos que se emplean para la gráfica y la regresión lineal	142
Cuadro N° 2: Valores de la concentración y el porcentaje de mortalidad para gráfico de Reed Muench con valores corregidos acumulados.	148
Cuadro N° 3: Valores de la concentración y el porcentaje de mortalidad para gráfico de Reed Muench con valores corregidos sin acumular.	151
Cuadro N° 4: Datos empleados y recogidos de los ensayos realizados con Artemia salina expuestos a concentraciones de dicromato de potasio para el método de Estimación Gráfica.	154

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Contenido	Páginas
Gráfico N° 1: Probit vs log de la concentración para determinar la LC ₅₀	143
Gráfico N° 2: %Mortalidad Vs Concentración del Dicromato De Potasio para el método de Reed Muench con valores acumulados corregidos.	149
Gráfico N° 3: %Mortalidad Vs Concentración del Dicromato De Potasio para el método de Reed Muench con valores acumulados sin acumular.	152
Gráfico N° 4: Representación de la CL50 del Dicromato de Potasio por el Método de Estimación Gráfica.	154

RESUMEN

La ecotoxicología nos permite conocer efectos adversos de las sustancias en los ecosistemas, mediante análisis de las rutas de exposición en un organismo. Siendo los ensayos de toxicidad, métodos reconocidos y empleados en muchos países, en el monitoreo y control de la contaminación del ecosistema. Este estudio se centró en la determinación de la concentración letal media del $K_2Cr_2O_7$, la valoración se llevó a cabo mediante el bioensayo en *Artemia salina* (nauplios de 24 horas de nacidos), por ser organismos representativos de la cadena trófica y presentar alta sensibilidad a alteraciones en su medio (agua de mar), para las pruebas de toxicidad se realizó el siguiente proceso: determinar concentración del tóxico que produce la muerte del 50% de la población expuesta (CL_{50}), utilizando el medio artificial a pH de 6,8, inyectando aire con una bomba con el fin de saturar de oxígeno la solución, controlar la eclosión de los huevos a 25 °C, pasadas 24 horas, se fabricó la solución madre del Dicromato y las de trabajo a concentraciones de 5,10, 15 y 20 ppm incluyéndose un grupo control, las cuales se emplearían para la posterior exposición de 10 nauplios, se analizó la aceptabilidad de los resultados y estimación de la concentración letal media, usando métodos estadísticos como Probit, Reed Muench y el de estimación grafica obteniéndose un índice de toxicidad para nuestra sustancia patrón, se emplearon varios métodos para comparar dichos valores y relacionarlos entre sí, optando por el más conveniente que en nuestro caso fue de 13,06 mg/l o ppm de $K_2Cr_2O_7$, obtenido por el método de Reed Muench con valores acumulados no corregidos. La investigación se ejecutó en el laboratorio de la carrera de Ingeniería Química de la Universidad Técnica de Manabí dando una pauta para emplear los bioensayos como instrumentos importantes y determinantes considerándolos como métodos biológicos de evaluación válidos para reforzar los análisis fisicoquímicos existentes dando una respuesta global a los contaminantes disueltos en las aguas que deberían ser considerados en las normas ambientales vigentes, abriendo un nuevo camino para el uso de este organismo en la valoración de toxicidad en nuestro país.

Palabras claves: Bioensayo, Toxicidad, *Artemia*, Dicromato De Potasio, Concentración Letal Media. Ecotoxicología

SUMMARY

Ecotoxicology lets us know adverse effects of chemicals on ecosystems through analysis of exposure pathways in an organism. Being toxicity testing, methods recognized and used in many countries, in the monitoring and control of pollution of the ecosystem. This study focused on the determination of the median lethal concentration of $K_2Cr_2O_7$, valuation is carried out by the *Artemia* saline bioassay (nauplii 24 hours old), as representative bodies of the food chain and its high sensitivity to changes in their environment (seawater) for toxicity testing was performed the following process: determining the toxic concentration that produces death in 50 % of the exposed population (LC_{50}) using the artificial medium at pH 6.8, injecting air with a pump in order to saturate the solution oxygen, control the hatching at 25 °C, after 24 hours, the mother solution of dichromate was made and working at concentrations of 5.10, 15 and 20 ppm being included a control group, which would be used for subsequent submission of 10 nauplii, the acceptability of the results and estimation of the median lethal concentration was analyzed using statistical methods such as Probit, Reed Muench and estimation graph obtained a toxicity index by our standard substance, several methods was used to compare those values and relate to each other, opting for the more convenient in our case was 13,06 mg/l or ppm of $K_2Cr_2O_7$, it obtained by the method of Reed Muench with accumulated values uncorrected. The research was carried out in the laboratory of the Chemical Engineering of Manabí Technical University, giving a guideline for using bioassays as important and decisive tools considering them as valid biological assessment methods to strengthen existing physicochemical analysis giving an overall response to contaminants dissolved in water that should be considered in environmental regulations, opening a new way for the use of this organism in the assessment of toxicity in our country.

Keywords: Bioassay, Toxicity, *Artemia*, Potassium dichromate, Lethal Concentration, Ecotoxicology.

TEMA

DETERMINACIÓN DE DICROMATO DE POTASIO COMO PATRÓN EN ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE ARTEMIA SALINA, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ 2013.

1. LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

El siguiente proyecto se realizó en la ciudad de Portoviejo, la cual es la cabecera del cantón del mismo nombre y capital de la provincia de Manabí, se ubica en el sector centro sur de la provincia, a aproximadamente 30 km del Océano Pacífico y a 36 km al noreste de la ciudad de Manta.

Su ubicación geográfica corresponde a $87^{\circ} 27$ minutos de longitud Oeste y $0^{\circ} 3$ minutos de latitud Sur.

La ciudad de Portoviejo se encuentra rodeada, de colinas de baja altura sobre el valle del Río Portoviejo. El cantón tiene una superficie de 967.5 kilómetros cuadrados y su altitud promedio es de 36 metros sobre el nivel del mar.

Limita al norte con los cantones Rocafuerte y Junín, al sur con el Cantón Santa Ana, al este con el cantón Bolívar, y al oeste con el Océano Pacífico.

FIGURA N°1

Mapa de la ciudad de Portoviejo



Fuente: Google maps

1.1. MACRO-LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí cuya ubicación está en la Avenida José María Urbina, vía a Crucita, de la Parroquia 12 de Marzo, en el Cantón Portoviejo, provincia de Manabí, cuyas coordenadas Geográficas son:

- Latitud: 1° 2' 46.48" Sur
- Longitud: 80° 27' 10.92" Oeste
- Elevación: 46 m
- Coordenadas U.T.M.
- 9'869100 57185

FIGURA N° 2

Ubicación de la Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas



Fuente: Google Earth

Elaborado por: Autores de Tesis

1.2. MICRO-LOCALIZACION

Los ensayos ecotoxicológicos considerados como el eje fundamental de esta investigación, fueron ejecutados en los Laboratorios de la Carrera de Ingeniería Química de la Universidad Técnica de Manabí, específicamente en el área designada para los estudios ecotoxicológicos, y de análisis de aguas.

FIGURA N° 3

Ubicación del Laboratorio de Química



Fuente: Google Earth

Elaborado por: Autores de Tesis

2. FUNDAMENTACIÓN

La Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas destaca de entre las mejores facultades de la Universidad Técnica de Manabí, de tal modo que desde sus inicios hasta la actualidad se han realizado muchos cambios positivos, sus principales directivos siempre se han esmerado en mejorar tanto en el aspecto educativo, como en el práctico; todo ello gracias al progreso científico y tecnológico que se vive actualmente en nuestro país.

Para la obtención del título profesional, es necesario realizar una tesis, de cualquier modalidad, ya sea de trabajo comunitario o de trabajo investigativo; la cual aportará en este caso a la Escuela de Ingeniería Química. Los autores de ésta tesis junto a las autoridades impulsados por la necesidad de realizar un trabajo investigativo, se decidió implementar un banco de reactivos, sustancias patrones, equipos y accesorios necesarios para el Laboratorio de Ecotoxicología, los cuales estarán a disposición de los estudiantes de la Carrera para realizar posteriores investigaciones de tipo ecotoxicológico.

Ésta tesis se fundamenta con una investigación sobre la determinación de Dicromato de Potasio como Patrón en Ensayos Ecotoxicológicos sobre Artemia Salina, la cual abre la puerta para posteriores investigaciones, y así fortalecer a nuestra Carrera, en el campo ecotoxicológico, y por ende ser los pioneros, en cuanto a trabajos y ensayos en esta rama de la toxicología realizado dentro del alma mater.

2.1. DIAGNÓSTICO DE LA POBLACIÓN

La carrera de Ingeniería Química de la Universidad Técnica de Manabí cuenta actualmente con dos laboratorios, que son el de Microbiología implementado hace un par de años, y el de Química, el cual funciona desde inicios de la creación de la Carrera.

Debido a los cambios positivos en los programas de estudios es necesario que tanto los estudiantes como los docentes de la Carrera cuenten con un conocimiento sobre los ensayos que se podrían realizar en un laboratorio de Ecotoxicología, ya que éste permite tener nociones mucho más puntuales sobre la toxicidad de los

contaminantes tales como metales pesados y los efectos que se generan debido a la bioacumulación y a su vez la biomagnificación que conllevan principalmente en la salud de los seres vivos.

El desarrollo de ensayos y análisis ecotoxicológicos en la Carrera de Ingeniería Química conllevaría a que los estudiantes de esta prestigiosa alma mater estén encaminados a ser profesionales capaces con nuevas visiones al momento de resolver problemas relacionados con los diferentes aspectos de la química ambiental, sobre todo como ya se lo expuso anteriormente con las consecuencias toxicológicas que podrían ocasionar ciertas sustancias químicas que se encuentren en el entorno ya sea en el agua, suelo o aire; lo cual ayudaría a conservar y evitar extinciones de especies vulnerables a químicos, tener información sobre qué ocurre debido al efecto de bioacumulación de metales y sustancias peligrosas, es decir, que se podría mantener al Medio Ambiente en condiciones óptimas para la vida de seres humanos.

Además se considera necesario establecer índices de toxicidad de diferentes sustancias patrones en modelos biológicos, ya que en nuestro país no existe investigación alguna sobre este tema. Por ello, una vez implementado el laboratorio, se procederá a realizar los ensayos necesarios para poder determinar índices de toxicidad, así como también la caracterización de los efectos y dosis requeridas de sustancias patrones en la exposición de diversos modelos biológicos.

Las autoridades de la Universidad Técnica de Manabí, en especial quienes pertenecen a la Carrera de Ingeniería Química están motivados y deseosos de seguir avanzando en el progreso científico y tecnológico de nuestra carrera y de la Universidad en general, por lo que están haciendo todo lo posible para poder lograr dicho pedido de estudiantes y docentes.

2.2. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La investigación que se desea realizar sobre la determinación de ciertos índices de toxicidad (toxicidad aguda) de sustancias patrones en este caso el Dicromato de potasio como tal, en modelos biológicos (*Artemia Salina*) se limita, ya que la Carrera de Ingeniería Química no cuenta con un laboratorio ecotoxicológico, en el cual se podría determinar los efectos que ocasionan la presencia de compuestos tóxicos peligrosos e incluso considerados como cancerogénicos, como lo es el Dicromato de potasio en el medio ambiente, el problema no radica en tan solo saber de la existencia de tal compuesto sino lo perjudicial que es para el ser vivo, debido al mecanismo de biomagnificación, por lo tanto se otorga debida importancia a la implementación del laboratorio y a la ejecución de ensayos ecotoxicológicos sobre modelos biológicos que nos permitan conocer dichas consecuencias.

De esta manera al cumplir con la investigación propuesta de obtener índices de toxicidad, caracterización de los efectos y dosis de sustancias patrones en la exposición de modelos biológicos, se da la pauta a los estudiantes junto con los docentes para que lleven a cabo las nuevas prácticas para obtención de conocimientos innovadores e incrementen oportunidades de futuras investigaciones, generando mucha más amplitud sobre la química ambiental, medioambiental y sobre todo la ecotoxicología.

2.3. PRIORIZACIÓN DEL PROBLEMA

El problema no solo está en la falta del laboratorio ecotoxicológico, sino que también en la implementación de reactivos, sustancias patrones, equipos y accesorios necesarios para el manejo de los mismos por parte de los estudiantes para la obtención de nuevas formas de prácticas relacionadas con la química ambiental, la toxicología y ramas afines.

La falta de conocimientos en cuanto a los niveles de toxicidad que poseen ciertos químicos (sustancias patrones) sobre algún o algunos organismos (modelos biológicos), se debe a la falta de prácticas, a la falta de análisis, a la falta de investigaciones, todo ello debido a que no se cuenta con el Laboratorio

ecotoxicológico, puesto que por medio de análisis espectrofotométricos solo se conoce de la existencia de tal contaminante mas no el grado de toxicidad que genera y las consecuencias que se generan por la bioacumulación con el tiempo.

Para desarrollar nuestra investigación es necesario contar con el laboratorio ecotoxicológico, ya que se necesita realizar las pruebas que permitan determinar la concentración del Dicromato de Potasio como sustancia patrón que produzca la muerte de la mitad de la población utilizada (*Artemia Salina* – Modelo Biológico), conocida como dosis letal media CL_{50} . Recalcando que para la validez del ensayo no solo se lo hará una vez, sino que a varias repeticiones con diferentes concentraciones para así obtener resultados mucho más fidedignos y que complementen análisis físicos químicos comúnmente practicados.

En otras palabras el mayor problema que limita la aplicación de bioensayos es el número restringido de laboratorios especializados. Aspecto que trata de paliarse, en gran medida, con la implementación de bioensayos alternativos para permitir llevar a cabo pruebas rutinarias de bajo costo, y con equipo y materiales básicos de laboratorio.

2.4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

- **CAMPO:** Medio Ambiente
- **ÁREA:** Ecotoxicología
- **ASPECTO:** Determinación de toxicidad mediante bioensayos

DELIMITACIÓN DE ESPACIAL: El presente proyecto se realizará en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Técnica de Manabí.

DELIMITACIÓN TEMPORAL: El presente proyecto se realizará durante el período de Noviembre del 2013 a Abril del 2014.

3. JUSTIFICACIÓN

Las nuevas leyes medioambientales estipulan que ante todo se realice una evaluación de impactos sobre el ecosistema y la salud humana, los cuales son provocados por las numerosas actividades humanas; nuestro país carece de investigaciones científicas relacionadas con efectos ecotoxicológicos, por lo tanto no se puede controlar fácilmente los efectos adversos que puedan provocar diferentes agentes tóxicos, como los metales pesados y sustancias peligrosas.

Se considera necesario realizar estudios de toxicidad, por lo que es fundamental implementar laboratorios y técnicas de ensayos ecotoxicológicos en diferentes puntos a nivel nacional.

En la actualidad la aparición de nuevos plaguicidas, la aplicación de nuevas sustancias, la generación de desechos industriales, la evaluación de la contaminación por emisiones, fugas, derrames y descargas, son algunos ejemplos de las diversas actividades que requieren de procedimientos estandarizados, como técnicas que permitan medir los impactos que ocasionan sobre los organismos y los ecosistemas. Actualmente dichas actividades se regulan únicamente con análisis fisicoquímicos, que no son capaces de medir los efectos biológicos como consecuencia. Por lo tanto, se debe dar la importancia de complementar dichos análisis con bioensayos de toxicidad para determinar los efectos sobre seres con vida, que puedan afectar directamente a los ecosistemas en general. Con la ejecución de ambos tipos de pruebas se contará con una visión más completa de los efectos adversos que se generan sobre los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas contaminados y se podrán tomar medidas integrales para proteger el ambiente, Estas técnicas son aplicables porque permiten establecer la toxicidad de una sustancia, ya sea de forma inmediata (toxicidad aguda) por la muerte e inhibición de los organismos, o porque a mediano o largo plazo (toxicidad crónica) se produce un efecto sobre el crecimiento, desarrollo y/o reproducción de los organismos. Se realizaron experimentos de toxicidad con *Artemia salina*, como bioindicador con el fin de determinar la concentración de compuestos de cromo tal como el Dicromato de potasio que produzca la muerte del 50% de la población expuesta CL_{50} . El cromo hexavalente es uno de los elementos más frecuentes en el recurso agua y a su vez un gran peligro

para vida , se empleara Dicromato de potasio como sustancia patrón para determinar las consecuencias que provoca la toxicidad de tal en Artemia Salina, debido a que el cromo en su forma como elemento puro no es capaz de penetrar las membranas intercelulares, sino que necesita una disolución en nuestro caso la sustancia patrón, para cuantificar el nivel de toxicidad y las adversidades que conlleva en los organismos vivos.

Muy localmente, se observa que la Universidad Técnica de Manabí, en la Carrera de Ingeniería Química no se cuenta con un Laboratorio Ecotoxicológico, el cual limita realizar investigaciones no sólo a estudiantes de la Universidad, sino también a profesionales de toda la provincia de Manabí interesados en el campo de la toxicidad.

Los ensayos de toxicidad con organismos acuáticos a nivel mundial son métodos reconocidos por la comunidad científica internacional y empleados en muchos países, como herramientas para el monitoreo y control de la contaminación hídrica. Sin embargo, cabe recalcar que en la normatividad Ecuatoriana vigente no nombra las pruebas de toxicidad por lo tanto las entidades encargadas no aplican este método para determinar las concentraciones máximas permisibles de contaminantes.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la toxicidad aguda de Dicromato de Potasio en Artemia Salina.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Describir el potencial impacto de Dicromatos $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{-2}$ y cromatos $(\text{CrO}_7)^{-2}$ al Ecosistema.
- Exponer a diferentes concentraciones de Dicromato de Potasio a la Artemia Salina empleada como modelo biológico alternativo en ecotoxicología.
- Determinar la concentración letal media (CL_{50}) del Dicromato de potasio en Artemia Salina y observar los efectos adversos.
- Tabular los resultados obtenidos mediante la relación dosis – respuesta, empleando el sistema de análisis de varianza ANOVA.
- Implementar un banco de reactivos, sustancias patrones, equipos y accesorios necesarios para el manejo de los mismos en las evaluaciones ecotoxicológicas en el Laboratorio.

5. MARCO CONCEPTUAL

5.1. DEFINICIONES

ACGIH: es la Conferencia Estadounidense de Higienistas Industriales Gubernamentales (American Conference of Governmental Industrial Hygenists). Recomienda los límites máximos de exposición (TLV) a sustancias químicas en el lugar de trabajo. (NJDHSS, 2013)

Actividades antrópicas: Cualquier acción o intervención que el ser humano implementa sobre la faz de la Tierra. (Global Foundation for Democracy and Development, 2014)

Bioacumulación: Proceso mediante el cual circulan y se van acumulando a lo largo de la cadena trófica una serie de sustancias tóxicas, las cuales pueden alcanzar concentraciones muy elevadas en un determinado nivel. (TULAS, 2003)

Biomagnificación: “La biomagnificación es un fenómeno que perjudica seriamente el desarrollo normal de los organismos en ecosistemas acuáticos y terrestres. (Wikipedia, 2013)

Carcinogenicidad: relativo a la capacidad de inducir el desarrollo de un cáncer.

Concentración Letal (CL): se denomina de esta forma a la concentración de una sustancia (pura o combinada), o efluente que produce la muerte del organismo.

Concentración Letal media (CL₅₀): es la concentración de la sustancia de interés, cuyo efecto tóxico potencial desea ser evaluado, que produce una tasa de mortalidad del 50% de los organismos vivos bajo condiciones de operación de un bioensayo. Este valor es determinado estadísticamente a partir de los porcentajes de mortalidad obtenidos de la lectura final del bioensayo.

Contaminante: sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal causada por la actividad antrópica directa o indirecta. Presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, o de combinaciones de los mismos en lugares, formas y concentraciones tales y con tal

duración que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de los seres vivos.

Cromatos: Cualquier sal del ácido crómico.

DEP: es el Departamento de Protección al Medio Ambiente de New Jersey. (New Jersey DOH Senior Services, 2013)

Dosis Letal: se conoce como cantidad de sustancia que resulta mortal al ser administrada

Dosis letal media LD₅₀: referida a la cantidad de sustancia que mata al 50% de la población.

Dosis letal mínima LD_{LO}: cantidad mínima de sustancia que resulta mortal al ser administrada.

Efectos letales: (López, 2009) Se menciona que en bioensayos, son las alteraciones que causan la muerte del individuo debidas a la presencia de un efecto tóxico.

Efectos subletales: En bioensayos, son las alteraciones o transformaciones morfológicas sobre un individuo de prueba que surgen por la presencia de un efecto tóxico.

Efectos tóxicos agudos: Efectos adversos sobre un organismo vivo que se presenta en un periodo de tiempo corto.

Ensayo de toxicidad: determinación del efecto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados conocidos también como efecto cuantal o el grado de efecto luego de la exposición a la muestra.

EPA: Environmental Protection Agency, Agencia de protección ambiental de EE.UU.

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO): Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un conjunto de moléculas reactivas producidas durante procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Las ROS son moléculas muy reactivas encontrándose entre ellas, los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos.

Estrés oxidativo: el deterioro y envejecimiento de las células cuando sobrepasa de manera descontrolada los límites que establecen los mecanismos antioxidantes se produce una concentración de radicales libres, una especie química, definida y peligrosa, caracterizada por su elevada reactividad y capacidad de formar otros radicales libres por reacción química en cadena, dañando a la célula.

Hemolinfa: líquido circulatorio de los artrópodos, moluscos, entre otros. Análogo a la sangre de los vertebrados. Su composición es muy variada de una especie a otra. Puede ser de diferentes colores o incluso incolora, no tienen ninguna función biológica, ya que el transporte de gases es independiente del aparato circulatorio.

Higroscópico: son todos los compuestos que atraen agua en forma de vapor o de líquido de su ambiente, por eso a menudo son utilizados como desecantes.

Ignición: Acción y efecto de estar un cuerpo ardiendo o incandescente. Ocurre cuando el calor que emite una reacción llega a ser suficiente como para sostener la reacción química. El paso repentino desde un gas frío hasta alcanzar un plasma se denomina también ignición. (Encured, 2011)

Metales pesados: son todos aquellos metales que tienen una densidad superior a 5 g/l.

Nauplio: es la primera larva característica de los crustáceos.

NIOSH: es el Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo (National Institute for Occupational Safety and Health). Prueba equipos, evalúa y aprueba los respiradores, realiza estudios sobre los peligros laborales y propone normas a la OSHA. (New Jersey DOH Senior Services, 2013)

RQ: Reactivo Químico

OSHA: es la Administración de Salud y Seguridad en el Trabajo (Occupational Safety and Health Administration), la agencia federal que promulga las normas de salud y seguridad y vigila el cumplimiento de dichas normas. (New Jersey DOH Senior Services, 2013)

Solución estándar: (López, 2009) una solución estándar o disolución estándar es una disolución que contiene una concentración conocida de un elemento o sustancia específica, llamada patrón primario que, por su especial estabilidad, se emplea para valorar la concentración de otras soluciones, como las disoluciones valorantes.

Teratógeno: es una sustancia que puede causar daño al feto y malformaciones en recién nacidos.

Toxicidad aguda: es el efecto letal que se produce después de exponer a los organismos prueba a sustancias (puras o combinadas) o efluentes una sola vez, durante un período corto. (López, 2009)

Toxicidad crónica: Es la habilidad de una sustancia o mezcla de sustancias de causar efectos dañinos en un período extenso, usualmente después de exposiciones continuas o repetidas. (TULAS, 2003, p. 292)

Toxicidad en agua: Es la propiedad de una sustancia, elemento o compuesto, de causar efecto letal u otro efecto nocivo en 4 días a los organismos utilizados para el bioensayo acuático.

Tóxico de referencia: es una sustancia química utilizada en bioensayos de toxicidad, cuyo efecto en los organismos a determinadas concentraciones es conocido, y por lo tanto, permite establecer el estado de respuesta de los organismos de prueba empleados, así como comparar los resultados intra e inter laboratorios .

5.2. MARCO LEGAL

5.2.1. CONSTITUCIÓN POLÍTICA DEL ECUADOR

La Constitución de la República del Ecuador aprobada y vigente desde el 20 de Octubre del 2008, en los términos más amplios la nueva Constitución Política del Ecuador establece los principios, así como los derechos y obligaciones de la ciudadanía en la parte correspondiente al medio ambiente. El sujeto de obligación, en este caso, es el Estado Ecuatoriano y los beneficiarios del derecho son los ciudadanos y la naturaleza, como se señala en los artículos principales que se indican a continuación:

En el **Art. 14:** Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

En la **Sección Sexta: Agua** considerando (Constitución de la República del Ecuador , 2008) el **Art. 411** cabe resaltar el siguiente enunciado: *“Se regulará toda actividad que pueda afectar la calidad y cantidad de agua, y el equilibrio de los ecosistemas, en especial en las fuentes y zonas de recarga de agua. La sustentabilidad de los ecosistemas y el consumo humano serán prioritarios en el uso y aprovechamiento del agua.”*; por lo tanto al considerar al Dicromato de potasio como un agente que afecte a los ecosistemas acuáticos y se puede regular las emisiones cuyas descargas sobrepasan los parámetros de niveles aptos.

5.2.2. LEY DE GESTIÓN AMBIENTAL

Con la Codificación 19, Registro Oficial Suplemento 418 de 10 de Septiembre del 2004, esta ley establece los principios y directrices de política ambiental; determina las obligaciones, responsabilidades, niveles de participación de los sectores público y privado en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones en esta materia. La Ley de Gestión Ambiental es la normativa fundamental para el cumplimiento de los objetivos señalados en la Constitución

referentes a los deberes del Estado y obligaciones de los ciudadanos para proteger el medio ambiente.

De acuerdo al **CAPITULO V** encontrado (Ley de Gestión Ambiental, 2004) que trata de **Instrumentos de Aplicación de Normas Ambientales**, según:

“Art. 33. Se Establéense como instrumentos de aplicación de las normas ambientales los siguientes: parámetros de calidad ambiental, normas de efluentes y emisiones, normas técnicas de calidad de productos, régimen de permisos y licencias administrativas, evaluaciones de impacto ambiental, listados de productos contaminantes y nocivos para la salud humana y el medio ambiente, certificaciones de calidad ambiental de productos y servicios y otros que serán regulados en el respectivo reglamento.”

Por lo tanto en el artículo anterior al no ser un estudio de calidad de agua, sino de evidenciar la toxicidad de un contaminante establecido, nos guiaremos en el listado de productos contaminantes y nocivos para la salud humana y medio ambiente, ya que con estudios más profundos posteriores se puede solicitar que se incluya a nuestro patrón en caso de no estar en la lista.

De acuerdo a la revisión bibliográfica de las leyes ecuatorianas relacionada al tema en estudio en el **Reglamento a la Ley De Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental** (Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente, 2003), en el **CAPITULO I** refiriéndose al **Art. 44** nos indica que el amparo de la Ley de Gestión Ambiental y el presente Texto Unificado de Legislación Secundaria Ambiental, el Ministerio del Ambiente, en su calidad de Autoridad Ambiental Nacional, en coordinación con los organismos competentes, deberá dictar y actualizar periódicamente las Normas Técnicas Ambientales Nacionales, las mismas que constan como Anexos al Libro VI De la Calidad Ambiental, tomando como fuente de relevancia dicho libro y sus anexos específicamente el Anexo VII donde se denota la carencia de la mención como sustancia peligrosa al Dicromato de potasio.

La toxicidad se ve renombrada en el **CAPITULO VII De Las Normas Ambientales Sección II Elaboración de las Normas de Calidad Ambiental**, puntualiza específicamente lo siguiente:

“Art. 116.- Recopilación de Información Científica *“Para la elaboración de las normas de calidad ambiental, el Ministerio del Ambiente recopilará los antecedentes y se encargará de la preparación de los estudios o investigaciones científicas, epidemiológicas, clínicas, toxicológicas y otros que sean necesarios, para establecer los niveles de seguridad ambiental para la sociedad y los ecosistemas. Los estudios deberán efectuarse en coordinación con las entidades públicas, privadas o académicas que el Ministerio del Ambiente considere apropiadas, principalmente con la Autoridad Nacional del Recurso y la Autoridad Nacional de Salud.”* (TULAS, 2003).

Y en el mismo capítulo **TÍTULO VI, Régimen Nacional Para La Gestión De Productos Químicos Peligrosos** refiriéndose al **Art.- 237** de acuerdo al siguiente literal expone:

“g) Establecer, mantener y actualizar las Listas Nacionales de Productos Químicos Prohibidos, Peligrosos y de Uso Severamente Restringido que se utilicen en Ecuador, priorizando aquellos que por la magnitud de su uso o por sus características de toxicidad y peligrosidad, representen alto riesgo potencial o comprobado para la salud y el ambiente.”

En el libro VI también se abarcan temas **Del Sistema Único de Manejo Ambiental**, en el Anexo I: Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua

Tomado de las Normas de Descarga de Efluentes a un Cuerpo de Agua o Receptor: Agua Dulce y Agua Marina, se estipula que: “Los regulados que exploren, exploten, refinen, transformen, procesen, transporten o almacenen hidrocarburos o sustancias peligrosas susceptibles de contaminar cuerpos de agua deberán contar y aplicar un plan de contingencia para la prevención y control de derrames, el cual deberá ser aprobado y verificado por la Entidad Ambiental de Control. Las normas locales para descargas serán fijadas considerando los criterios de calidad establecidos

para el uso o los usos asignados a las aguas. Las normas guardarán siempre concordancia con la norma técnica nacional vigente, pudiendo ser únicamente igual o más restrictiva y deberán contar con los estudios técnicos y económicos que lo justifiquen.”

Por lo tanto al manifestarse un posible efecto toxicológico perjudicial debido a la bioacumulación en seres vivos, se podría en un futuro regular dicha ley para que se controle el vertimiento del toxico en estudio Dicromato de potasio.

En la siguiente tabla se resumen los niveles permisibles del Cromo hexavalente, que se presenta comúnmente como cromatos y dicromatos, hacia la calidad del agua, sobresaliendo los valores en el medio marino, debido que será el entorno en el cual se desarrolla nuestro modelo biológico definido en la Artemia Salina, dichos valores son tomados como referencia en nuestro estudio puesto a que no se toma en cuenta al Dicromato de potasio en la ley vigente.

TABLA N° 1

Límites permisibles de Cromo y sus formas químicas encontrados en el recurso agua según los anexos del TULAS

Límites permisibles de Cromo y sus formas químicas													
Metal y Forma química		Unidad	AGUA										
			Consumo		Perservacion de flora y fauna			Subterranea en µg/l	Uso Agrícola	Uso pecuario	Descargas		
			Tratamiento Convencional	Desinfeccion	Fria Dulce	Calida Dulce	Marina				S. de alcantari llado	Agua Dulce	Agua Marina
Cromo hexavalente	Cr ⁺⁶	mg/l	0,05	0,05					0,1	1	0,5	0,5	0,5
Cromo Total	Cr	mg/l			0,05	0,05	0,05	16					

Fuente: Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria Libro 6, Anexo 1, datos extraídos de Tablas 1,2, 3,5,6,8,11,12 y 13

Elaborado por: Autores de Tesis

De acuerdo al **LIBRO VI Anexo VII: Listados Nacionales de Productos Químicos Prohibidos, Peligrosos y de Uso Severamente** se toma los siguientes artículos:

“Art. 1.-se debe Declarar a las sustancias que se indica en el siguiente cuadro, como productos químicos peligrosos sujetos de control por el Ministerio del Ambiente y que deberán cumplir en forma estricta los reglamentos y las Normas INEN que regulen su gestión adecuada” (TULAS, 2003)

“Art. 4.- El Ministerio del Ambiente definirá los procedimientos así como establecerá los plazos para la eliminación definitiva de las sustancias indicadas como prohibidas, para lo cual será asesorado por la Secretaría Técnica de Gestión de Productos Químicos Peligrosos.” (TULAS, 2003)

TABLA N° 2

Diferentes compuestos del Cromo considerados como “Productos Químicos Prohibidos” que se utilicen en el Ecuador:

N°	Nombre	Fórmula Química
73	Cloruro de Cromo III	CrCl ₃
78	Cromatos de Plomo	PbCrO ₄
79	Cromatos de Zinc	ZnCrO ₄
80	Cromo	Cr: 2,3,4,5,6
82	Dicromato de Sodio	NaCr ₂ O ₇
165	Sulfato de Cromo (crómico)	Cr ₂ (SO ₄)
180	trióxido de Cromo (anhídrido crómico)	CrO ₃
181	Trióxido de Dicromo (óxido verde)	Cr ₂ O ₃

Fuente: Cuadro N°1 del Anexo 7 del libro 6 del TULAS

Elaborado por: Autores de Tesis

De acuerdo a lo revisado y expuesto en párrafos anteriores se debe tener muy en cuenta que en todas las leyes ambientales vigentes no se tiene un parámetro o límite permisible máximo o mínimo, del compuesto en estudio en este caso el Dicromato de potasio, solamente se considera al ion cromo hexavalente . Es decir no existe registro de datos que lo incluyan como compuesto toxico y peligroso en ninguno de los recursos del ambiente tal como agua y suelo, por lo tanto esto nos brinda una pauta

para realizar el trabajo de investigación de qué tan toxico es y cómo puede afectar a la biodiversidad.

5.3. QUÍMICA AMBIENTAL

La química ambiental, llamada también química medioambiental es la aplicación de la química al estudio de los problemas y la conservación del ambiente, definido por (Baird., 2013). Además se encarga del estudio de procesos químicos en el medio ambiente global, o en alguna de sus partes: el suelo, los ríos y lagos, los océanos, la atmósfera, además del impacto de las actividades humanas sobre el entorno y la problemática que ello ocasiona. Desde su estudio relacionado con el ecologismo el tratado de Kioto es uno de los primordiales dándole peso para que se sigan efectuando novedosos estudios. Asimismo la química medioambiental se ocupa de los procesos, reacciones, evolución e interacciones que tienen lugar en las masas de aguas continentales y marinas por el vertido de contaminantes antropogénicos. Del mismo modo, estudia los tratamientos de dichos vertidos para reducir su carga dañina.

La función primordial de la química ambiental es la de realizar la supervisión de los proyectos industriales, teniendo en cuenta el impacto ambiental. En la siguiente tabla se detallan algunos compuestos nocivos para el hombre y el medio ambiente.

TABLA N° 3
Algunos compuestos químicos nocivos para el hombre y el medio

Mono, di y trietanolaminas	Inhibidor de corrosión	Irritante y alérgico
Polietilenglicol y propilenglicol	Base en fluidos sintéticos	Alérgico
Cromo, cromatos y dicromatos	Proviene del metal cortado	Alérgico, irritante, riesgos cancerígenos y mutagénicos.
Aditivos sulfoclorados y parafinas cloradas	Aditivos e.p.	Irritantes y riesgos cancerígenos
Alquilditiofosfato de cinc	Aditivos antidesgaste y antioxidante	Irritantes, alérgicos, causan polineuritis
Fenoles, formoles, derivados y compuestos de boro	Aditivos anti desarrollo microbiano	Irritante. Alérgicos y ambientalmente muy nocivos
Nitritos	Aditivos anticorrosión	Formación de nitrosaminas cancerígenas

Fuente: (ISTAS)

Elaborado por: Autores de Tesis

5.4. SUSTANCIAS PATRONES

De acuerdo a la publicación revisada de (Nuñez, 2007) las sustancias patrones, son unas pocas a las que se pueden considerar como tal ya que deben poseer algunas de las siguientes cualidades:

- Servir para los análisis comunes en laboratorio, es decir las titulaciones ácido base y las titulaciones Redox,
- Ejercer reacciones rápidas y de punto final claro,
- Deben ser de fácil purificación,
- Ser estables a través del tiempo,
- No ser hidratos y no ser volátiles.

Las más utilizadas tenemos: el yodato de potasio y el ácido oxálico, el Dicromato de potasio. Aunque existe una variedad mucho más amplia que es poco utilizada en los laboratorios entre ellas algunas sustancias generales como especiales de acuerdo al tipo de trabajo que se desee realizar.

Se utiliza el Dicromato de Potasio como sustancia patrón para la ejecución de los ensayos ecotoxicológicos, ya que de acuerdo a estudios realizados el cromo hexavalente es tóxico en su forma de Dicromato y al ser el Dicromato de potasio que en su composición contiene el 35% de cromo (+6) su facilidad de conseguir y de un bajo costo económico, reuniendo muchas de las características que se necesitan para considerarse un patrón apto, recalando a la vez que el compuesto mencionado ha sido utilizado en ensayos ecotoxicológicos y fisicoquímicos como tóxico de referencia.

5.5. AGENTES TÓXICOS QUE REPRESENTAN AMENAZAS A LARGO PLAZO

Algunas sustancias químicas que se encuentran en el entorno se descomponen poco a poco siendo asimiladas por procesos naturales. De tal modo que al estar diluidas no proyectan riesgos para el ambiente. Sin embargo existen dos clases de sustancias químicas que no se diluyen:

- Metales pesados y sus compuestos: Los metales pesados con mayor peligro son el plomo, mercurio, arsénico, cadmio, estaño, cromo, zinc y cobre. Entrando en el ambiente con el accionar las industrias que los emplee o desechen. “Los metales pesados son de toxicidad extrema porque como iones o en ciertos compuestos, son solubles en agua y el organismo los absorbe con facilidad. Dentro del cuerpo, tienden a combinarse con las enzimas y a inhibir su funcionamiento”, (UNAL, 2000).
- Compuestos sintéticos no biodegradables: son la base de todos los plásticos, fibras, y gomas sintéticas, barnices, solventes, pesticidas, conservantes de la madera, y cientos de otros productos. Muchos de estos productos sólo son útiles si son "no biodegradables". Siendo sustancias tóxicas porque se asemejan a los compuestos orgánicos naturales, normalmente asimilados por el cuerpo.

TABLA N° 4

Ejemplos de compuestos tóxicos que aparecen a menudo en los desechos químicos

Contaminantes y su efecto sobre la salud en caso de valores extremos	
Arsénico	Cancerígeno (piel, pulmones), calambre, daños en el sistema nervioso.
Bario	Efecto sobre el estímulo y la contracción muscular, influencia sistema nerviosos
Benceno	Cancerígeno, leucemia, anemia
Cadmio	Problemas bronquiales y pulmonares, anemia, dolores gastrointestinales, daños al hígado y riñones
Chlordan	Cancerígeno, daños en el hígado y riñones
Cromo	Daños en el riñón, cáncer
Diclorobenceno	Aparentemente cancerígeno, daño del sistema nervioso central
1,1 Dicloroetano	Daños en el hígado, Aparentemente cancerígeno, vómito
Níquel	Molestias gastrointestinales y del sistema nervioso.
Pentaclorofenol (PCP)	Pérdida del apetito, problemas respiratorios, coma, la muerte.
Mercurio	Daños renales, efectos mortales
Selenio	Cancerígeno, inflamaciones de la piel y las mucosas
Sulfato	Diarrea
Tetracloroetileno	Daños del sistema nervioso central, cancerígeno
Tolueno	Efecto narcótico, inflamación de los ojos y vías respiratorias
Tricloroetileno	Tricloroetileno Daños del sistema nervioso central, pérdida de la coordinación, cancerígeno, corrosivo fuerte
2,4,6-Triclorofenol	Presumiblemente cancerígeno
Dicloroetileno	Vómito
Etilenbromuro (EDS)	Impotencia, cuando hay efecto crónico afecta los huesos o cancerígeno

Fuente: (Epstein, Lester, Brown, & Pope, 1982.)

Elaborado por: UNAL

5.6. TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS EN AGUA

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la tierra, haciendo parte de la corteza terrestre y disuelta en todos los sistemas acuáticos en diferentes grados de concentración. Sin embargo su concentración es variable y su circulación en la biosfera se realiza a través de diferentes ciclos biogeoquímicos.

A través de los procesos orogénicos (movimientos abruptos que originaron las montañas) se produce una entrada constante de compuestos metálicos a los ecosistemas. La actividad volcánica y la erosión son consideradas como las mayores contribuyentes en el aumento de las concentraciones de metales hacia el ambiente. Estos procesos forman depósitos terrestres superficiales o profundos donde están concentrados o son disueltos por el agua.

Los metales pesados son una de las formas más peligrosas existentes de contaminantes sobre el medio ambiente, esto se debe a que no presentan ningún tipo de degradación biológica o química con el pasar del tiempo. Del mismo modo, estos metales, pueden ser bioacumulados en diversas formas (inorgánicas o como compuestos orgánicos) y permanecer en los organismos por largos periodos. También este tipo de metales pueden tener efectos adversos altamente tóxicos para diferentes organismos, afectando procesos biológicos a nivel celular, poblacional, comunitario y ecosistémico.

Generalmente, los metales pesados, frecuentemente se pueden encontrar en la naturaleza en forma de óxidos, sulfuros, carbonatos, sulfatos y cloruros. Para obtenerlo de estos minerales el metal del compuesto ha de ser reducido.

La toxicidad de los metales pesados repercute a su alta afinidad con los grupos amino y sulfhídrico, que al reaccionar producen complejos metálicos y las enzimas pierden toda su efectividad para controlar las reacciones metabólicas.

Los factores que influyen en la toxicidad de los metales de acuerdo a lo expuesto por publicaciones de Cairos & Prat (1989) y Gadd and Griffiths (1978), citado por Hoyos (1995) se resume en los siguientes puntos:

- Las características del ambiente acuático tales como: dureza, pH, compuestos orgánicos disueltos, acidez, carbonatos, entre otros.
- Las transformaciones que se pueden dar en el ambiente acuático por cambios en el estado de oxidación, etc., ocasionado por la acción bacteriana, unión de metales con compuestos orgánicos, precipitación, formación de complejos e interacciones iónicas.

- La forma en que se encuentre el químico en el agua como ión o como compuesto.
- La concentración en que se encuentre el metal.

Los metales pesados, como cromo, arsénico, cadmio, cobre, plomo, mercurio, etc., se caracterizan por su alta conductividad eléctrica, por tener una densidad mayor a 6.0 g/cm³ y a medida que se desplazan hacia los metales preciosos (oro y plata) sus óxidos metálicos forman compuestos muchos más complejos con diferentes moléculas. Su estado físico está definido por el tamaño y, la especie química lo estará por (Hoyos, 1995): su estado de óxido-reducción, el tipo de uniones químicas (iónicas o covalentes) y el tipo de asociación de las diferentes especies físicas.

En el siguiente tabla se detalla de manera resumida los métodos de determinación de metales pesados por espectrofotometría, en la cual se expone el fundamento y en claro que para la determinación de presencia, dicho método emplea sustancias patrones para comprobar el existencia del ion de metal en el recurso agua.

TABLA N° 5

Métodos de determinación de metales pesados en el agua por espectrofotometría

Metal	Forma Química	MÉTODO DE DETERMINACIÓN				SUSTANCIA PATRÓN	
		FUNDAMENTO	Equipo	Modelo	Norma		
Cianuro	CN	Método espectrofotométrico	Los cianuros, como ácido cianhídrico (HCN), son liberados por el reflujo de la muestra con un ácido fuerte, el ácido cianhídrico se adsorbe en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH). El ion cianuro en la disolución adsorbente se determina entonces por espectrofotometría. En la medición espectrofotométrica, el cianuro se convierte en cloruro de cianógeno (CNCl) por reacción con cloramina-T a un pH menor de 8 evitando que se lleve a cabo la hidrólisis de los cianuros. Después de que la reacción termina, el color se forma por la adición del reactivo ácido piridin-arbitúrico. La concentración de hidróxido de sodio (NaOH) debe ser la misma en los estándares y la muestra para obtener colores comparables de intensidad.	espectofotometro de absorcion atomica	HACH 2700	U.S. EPA 200.8	Basados en la concentración determinada para la disolución madre (Pesar aproximadamente y con precisión 1,6 g de hidróxido de sodio y 2,510 g de cianuro de potasio, disolverlos en 500 mL de agua y llevar a 1 L con agua.), calcular el volumen requerido (aproximadamente 25 mL) para preparar 1 L de una disolución de 25,0 µg CN ⁻ /mL y aforar con la disolución diluída de hidróxido de sodio. Tomar una alícuota 100 mL de la disolución de 25,0 µg CN ⁻ /mL y aforar a 1 L con la disolución diluída de hidróxido de sodio (1,0 mL = 2,5 µg CN ⁻).
Cromo	Cr VI	Cromo Hexavalente	El método colorimétrico se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra.	espectofotometro de absorcion atomica	HACH 2700	U.S. EPA 200.8	Diluir 10 cm ³ de la solución madre (Disolver 141,4 mg de dicromato de potasio anhidro, K ₂ Cr ₂ O ₇ , en agua destilada y diluir hasta 1 000 mm ³ ; 1mm = 50,µg de cromo hexavalente) hasta 100 cm ³ con agua destilada; esta solución debe prepararse diariamente; 1 mm contiene 5 microgramo de cromo hexavalente.

Metal	Forma Química	MÉTODO DE DETERMINACIÓN				SUSTANCIA PATRÓN	
		FUNDAMENTO	Equipo	Modelo	Norma		
Mercurio	Hg Total	Absorción Atómica con Vapor Frío	La determinación de mercurio total en aguas y sedimentos mediante la técnica de Absorción Atómica con Vapor Frío ha ganado amplia difusión. Para efectuar dicha determinación, el mercurio unido a grupos orgánicos debe ser previamente liberado de esa unión a través de la oxidación de la materia orgánica, antes de ser reducido a mercurio elemental. El tratamiento consiste en la destrucción de la materia orgánica por medio de HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , KMnO ₄ , y en algunos casos K ₂ S ₂ O ₈ como preoxidante, con calentamiento a 95°C.	espectofotmetro de absorcion atomica	HACH 2700	U.S. EPA 200.8	Solución patrón de mercurio (1000 mg /l en ácido nítrico 0.5mol/l MERK). En caso de no disponer de la solución patrón comercial, se prepara disolviendo 1,354 g de cloruro de mercurio (II) en 50 ml de ácido nítrico y se añade agua destilada hasta completar 1 litro de disolución.
Plomo	Pb II	MÉTODO DE LA DITIZONA	El método se basa en la separación del plomo en forma de complejo, ditizonato de plomo de color rojo, seguido de la determinación colorimétrica. La intensidad del color rojo de la solución a 510 nm en un espectrofotómetro es proporcional a la concentración de plomo.	espectofotmetro de absorcion atomica	HACH 2700	U.S. EPA 200.8	Disolver 0,1599 g de nitrato de plomo Pb (NO ₃) ₂ , e aproximadamente 200 cm ³ de agua. Añadir 10 cm ³ de ácido nítrico concentrado, HNO ₃ , y diluir a 1000 cm ³ con agua. Se puede preparar también disolviendo 0,1 000 g de plomo metálico puro en 20cm ³ de HNO ₃ , 1 + 1 diluyendo a 1 000 cm ³ con agua; 1, 00 cm ³ = 100µg Pb.

Fuente: Normas INEN para determinación de cada uno de los metales, US. EPA 200.8

Elaborado por: Autores de Tesis

5.6.1. CROMO

El cromo es un elemento químico de número atómico 24 y símbolo Cr, que se encuentra en el grupo 6 de la tabla periódica, elemento natural que se encuentra comúnmente en las rocas, los animales, las plantas, el suelo y en polvo y gases volcánicos. El cromo está presente en el ambiente de diversas formas químicas. Las formas más comunes son el cromo metálico (0), el cromo trivalente (III) y el cromo hexavalente (VI).

El cromo (III) se produce naturalmente en el ambiente considerado como un elemento nutritivo esencial que el cuerpo requiere para algunas funciones metabólicas del organismo. El cromo generalmente se manifiesta en el medio ambiente de la forma trivalente. Bajo ciertas condiciones químicas, el cromo puede cambiar de una forma a la otra.

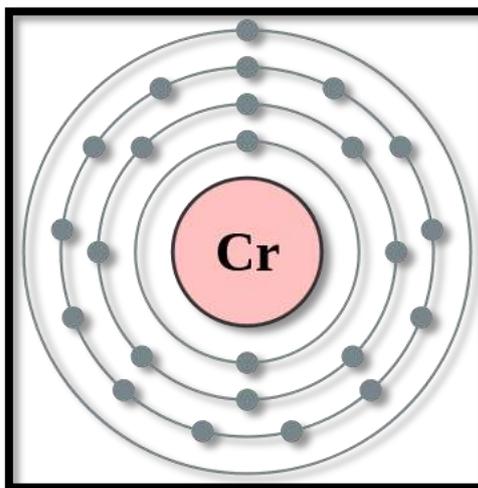
El cromo hexavalente (Cr^{+6}) es un metal que se localiza espontáneamente en el agua, el suelo y las rocas. Puede estar presente en los cultivos y como elemento remanente en los suelos agrícolas.

TABLA N°6
Características generales del cromo.

Nombre	Cromo
Número atómico	24
Valencia	2,3,4,5,6
Estado de oxidación	3
Electronegatividad	1,6
Radio covalente (Å)	1,27
Radio iónico (Å)	0,69
Radio atómico (Å)	1,27
Configuración electrónica	$[\text{Ar}]3d^54s^1$
Primer potencial de ionización (eV)	6,8
Masa atómica (g/mol)	51,996
Densidad (g/ml)	7,19
Punto de ebullición (°C)	2665
Punto de fusión (°C)	1875
Descubridor	Vaughlin en 1797

Fuente: (Lenntech, 1998)

FIGURA N° 4
Modelo atómico del cromo



Fuente: <http://atomos3veritas.wikispaces.com/Cr+++Cromo>

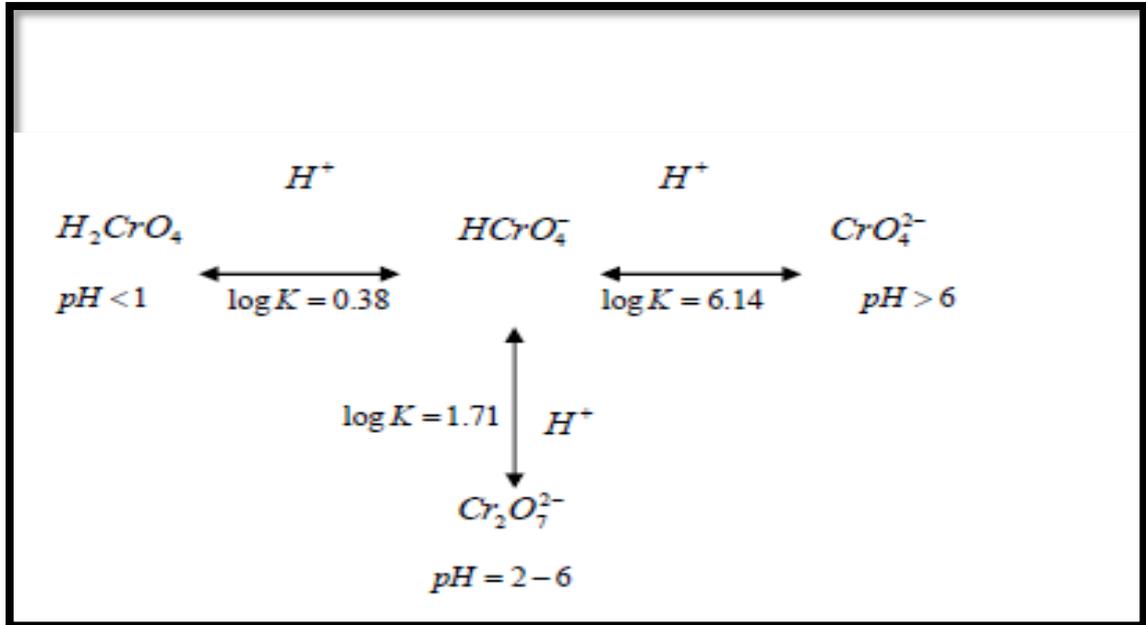
El Cr VI se halla comúnmente en su forma de oxianiones hidrosolubles, cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), los compuestos de Cr (VI) son oxidantes fuertes y altamente solubles, mientras que los compuestos de Cr III tienden a formar precipitados relativamente inertes a pH cercanos a la neutralidad (Nuñez, 2007).

Los compuestos de cromo hexavalente existen principalmente como ácido crómico (H_2CrO_4) y sus sales ión hidrógeno cromato HCrO_4^- , ión cromato CrO_4^{2-} , dependiendo del pH, (Guevara, 2010, págs. 23-25), predominando el ácido crómico H_2CrO_4 , ión hidrógeno cromato HCrO_4^- , e, ión cromato CrO_4^{2-} , en función del pH; el primero a pH inferiores que 1, el segundo a pH entre 1 y 6 y el último a pH sobre 6. Siendo el ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) un dímero del ión hidrógeno cromato HCrO_4^- , resultante del excedente de la concentración aproximadamente 1 g.L^{-1} del cromo.

Dependiendo de la concentración de cromo y el pH de la solución, el Cr VI puede existir principalmente como ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), ión hidrógeno cromato (HCrO_4^-) y ácido crómico (H_2CrO_4) de acuerdo a la siguiente ecuación (Hossain, Kumita, Michigami, & Mori, 2005).

FIGURA N° 5

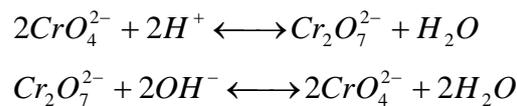
Especies de cromo VI dependiendo del pH



Fuente: (Guevara, 2010, pág. 23) citado en (Hossain, Kumita, Michigami, & Mori, 2005)

En los aniones cromato (CrO_4^{2-}), o dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$), el cromo es hexavalente y derivan del trióxido de cromo. Los iones cromatos son amarillos y los dicromato son de color naranja.

Los cromatos se transforman rápidamente e dicromatos con el agregado de ácido:



5.6.1.1. El cromo en la industria

De Acuerdo a los estudios y reportes de la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, 2006), pronuncia los siguiente; el cromo (VI) y el cromo (0) son producidos generalmente por procesos industriales. No se ha asociado ningún sabor u olor con los compuestos de cromo. El cromo metálico (cromo cero [0]), es un sólido de color acero-grisáceo que se derrite a temperatura muy alta. Se usa principalmente para producir acero y otras aleaciones (mezclas de metales). El mineral cromita, que contiene la forma de cromo (III) y que se produce

naturalmente, se usa como ladrillo de revestimiento en hornos industriales, en la manufactura de metales y aleaciones y de sustancias químicas. Los compuestos de cromo, principalmente las formas de cromo (III) y (VI), de acuerdo a la siguiente lista se puede generar en diversas industrias:

- Soldadura de acero inoxidable (cromo VI)
- Manufactura de cromato (cromo VI)
- Cromado de metales (cromo VI)
- Industria de ferrocromo (cromo III y cromo VI)
- Pigmentos de cromo (cromo III y cromo VI)
- Curtido de cuero (principalmente cromo III)

Los siguientes son algunos ejemplos de otras ocupaciones en las que puede ocurrir exposición al cromo:

- Pintores (cromo III y cromo VI)
- Trabajadores que mantienen o reparan copiadoras y que desechan polvos de toner de copiadoras (cromo VI)
- Fabricantes de baterías (cromo VI)
- Fabricantes de velas (cromo III y cromo VI)
- Fabricantes de colorantes (cromo III)
- Impresores (cromo III y cromo VI)
- Fabricantes de caucho (cromo III y cromo VI)
- Trabajadores en la industria del cemento (cromo III y cromo VI)

Las personas pueden estar expuesto a niveles de cromo más altos que lo normal si vive cerca de:

- Vertederos con desechos que contienen cromo
- Plantas industriales que manufacturan o usan cromo y compuestos que contienen cromo
- Plantas que producen cemento, porque el cemento contiene cromo
- Torres industriales de refrigeración que en el pasado usaron cromo como inhibidor de corrosión

- Corrientes de agua que reciben descargas de industrias de galvanoplastia, curtido de cuero y textiles.
- Carreteras con mucho tráfico, porque las emisiones del revestimiento de los frenos de automóviles y de los convertidores catalíticos contienen cromo.

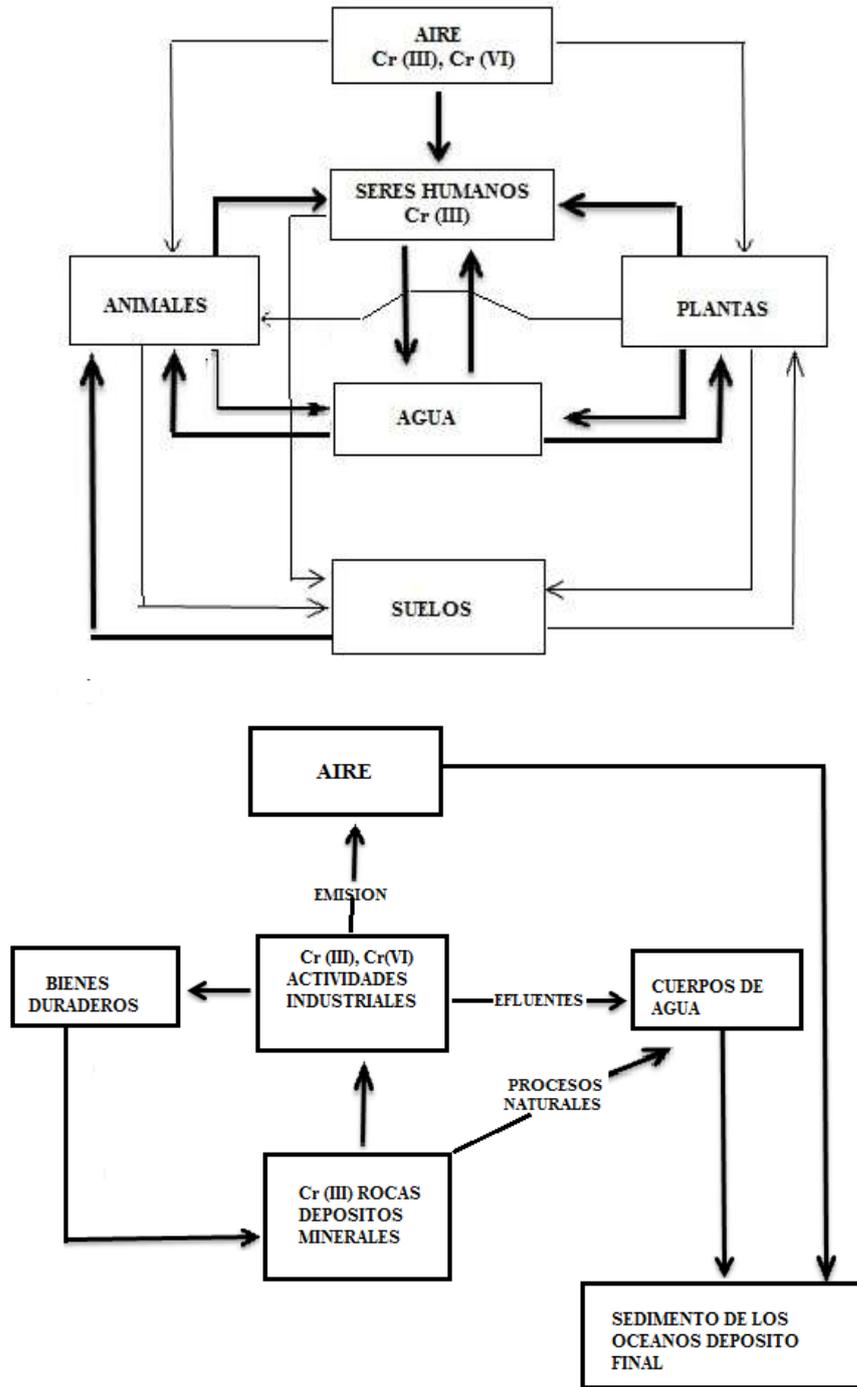
5.6.1.2. Química Ambiental del Cromo

Generalmente, los efluentes industriales que contienen cromo se anexan a las aguas llegando al océano, su forma química dependerá de la de materia orgánica que se encuentre en las aguas, ya que si existen grandes cantidades, el cromo (VI) se reducirá a cromo (III), el cual se podrá absorber en las partículas o formar complejos insolubles. Los cuales pueden ser llevados al océano al permanecer en suspensión cerca del sitio de entrada al ambiente, o pueden precipitar formando parte de sedimentos. Ocurriendo un proceso similar en el océano. Expuesto en Albert, (2002) “la proporción de cromo (III) es directamente proporcional a la profundidad de los sedimentos”.

Los incendios forestales y otros procesos de combustión permiten la entradas del cromo al ambiente, desconociéndose el estado de oxidación del cromo emitidos, pero aun así se cree que esta en su forma hexavalente. En la figura siguiente se resumen el transporte de cromo en el ambiente:

FIGURA N°6

Ciclo ambiental del cromo



Fuentes: (Albert, 2002)

5.6.1.3. Toxicidad del Cromo.

El estado de oxidación del cromo influye sobre los efectos biológicos. Debido a la capacidad de atravesar fácilmente las membranas biológicas y a la capacidad de ser movilizado activamente al interior de las células mediante el transportador de sulfato, por su analogía química con dicho radical, el Cr VI es considerado la forma más tóxica del metal.

El Cr VI es sumamente tóxico para todo ser vivo, debido a muestras de su efecto mutagénico y carcinogénico en el hombre y mutagénico en bacterias. Revelándose que la toxicidad del Cr VI se debe a que, produce estrés oxidativo al igual que otros metales pesados. Proceso en el cual se generan intermediarios reducidos de cromo que, en presencia de H₂O₂, actúan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, dando lugar a la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), todo esto sucede en el interior de las células. Por lo tanto el cromo hexavalente de acuerdo con lo enunciado en (Gutiérrez & Cervantes, 2008) “conduce al consecuente daño oxidativo de las células, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daños a los ácidos nucleicos”.

Sin embargo, el Cr III es relativamente inocuo por su insolubilidad e incapacidad para atravesar las membranas biológicas; siendo tan solo un oligoelemento indispensable en dosis muy bajas para procesos bioquímicos y fisiológicos en células superiores.

5.6.1.4. Sus efectos sobre la salud

El cromo +3 es un nutriente esencial necesario para, para promover la acción de la insulina de manera que los azúcares, las proteínas y las grasas, puedan ser utilizadas por el organismo y para muchas reacciones enzimáticas.

La EPA ha determinado que el cromo hexavalente es un metal cancerígeno. Debido a las propiedades carcinógenas de algunos compuestos de cromo se ha establecido que el agua potable no debe exceder ciertos niveles de contenido.

Los efectos potenciales sobre la salud del cromo dependen de un sin número de factores, como la forma química, la cantidad, el tiempo de exposición y la manera de incorporación al organismo (ingestión, inhalación o absorción a través de la piel). Las reacciones y sus efectos potenciales dependen de algunos factores; como edad, sexo, peso corporal y estado de salud del sujeto.

Se conoce que el cromo (VI) es cancerígeno por inhalación. Los riesgos potenciales del cromo (VI) en la actividad industrial con el pasar del tiempo han sido considerablemente documentados. Diversos análisis de laboratorio también han arrojado evidencias concluyentes de que el cromo (VI) puede alterar el ADN e inducir mutaciones genéticas. El índice de eliminación es lento. Por otra parte, todavía no se sabe con certeza si el cromo (VI) es carcinógeno a los niveles encontrados en el agua potable.

Reportes documentados de investigaciones por la EPA y departamentos de toxicologías (UCDAVIS, 2010) se ha fijado el contenido máximo de cromo en el agua corriente en 50 μ /l, no se han identificado los efectos a largo plazo sobre la salud por el consumo de agua con un contenido de cromo que supera dicho valor.

5.6.2. DICROMATO DE POTASIO

5.6.2.1. Generalidades:

El dicromato de potasio tiene como fórmula química la siguiente $K_2Cr_2O_7$, es una sal del hipotético ácido dicrómico (este ácido en sustancia no es estable) $H_2Cr_2O_7$, es considerada como un oxidante fuerte.

Se encuentra en estado sólido cristalino y posee un color naranja-rojizo, sus cristales son triclinicos pinacoidales; soluble en agua; diferenciándose del dicromato de sodio al no ser higroscópico.

La sustancia es muy tóxica para los organismos acuáticos. La sustancia puede causar efectos prolongados en el medio acuático.

El dicromato de potasio está en la Lista de Sustancias Peligrosas, ya que está reglamentado por la OSHA y ha sido citado por la ACGIH, el DOT, el NIOSH, el DEP y la EPA. Esta sustancia química está en la Lista de Sustancias Extremadamente Peligrosas para la Salud (Special Health Hazard Substance List) ya que es un CARCINÓGENO. (NJDHSS, 2013)

5.6.2.2. Características:

Las siguientes características se obtuvieron desde el sitio (Encured , 2013), tenemos:

- Formula Química: $K_2Cr_2O_7$
- Composición: Cr: 35.36 %; K: 26.58 % y O: 38.07 %.
- Peso Molecular: 294.21 g/mol

5.6.2.3. Propiedades químicas:

Este compuesto reacciona de forma violenta con ácido sulfúrico y acetona o hidracida, Reacciona explosivamente con hidroxilamina y con etilenglicol a 100 °C generando una reacción exotérmica (libera calor). Este compuesto tiene reacciones pirotécnicas al mezclarlo con hierro metálico, tungsteno metálico y boro.

Generalmente, es incompatible con agentes reductores, materiales orgánicos y con materiales combustibles que se encuentren como partículas pequeñas, pues puede haber ignición.

5.6.2.4. Modo de obtención

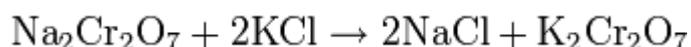
Se obtiene mediante la reacción de intercambio catiónico entre cloruro de potasio y dicromato de sodio y por tostado de cromito y carbonato de potasio sometida a una temperatura entre 900 y 1000 °C.

5.6.2.5. Síntesis

De acuerdo a lo mencionado en (Wikipedia, 2014) su síntesis se da a partir del cromato potásico acidulando la disolución correspondiente:



Por intercambio del catión



5.6.2.6. Reacciones

Reacción usada ocasionalmente para la determinación cualitativa del cromo (VI).

Los cromatos se precipitan en forma de sólidos amarillos en presencia de iones de bario o de plomo (II) en disolución neutra o levemente ácida. Disolviéndose ambos en ácidos fuertes, o en una base fuerte en el caso del cromato de plomo. Sustancias empleadas como pigmentos en varias pinturas amarillas.

Forma el anión ClCrO_4^- en disolución ácida y presencia de cloruro que se cristaliza en estado de su sal potásica. Que al calentarlo con ácido clorhídrico concentrado forma cloruro de cromil (Cl_2CrO_4), sustancia anaranjada molecular que puede ser destilada de la mezcla de reacción.

5.6.2.7. Sinónimos utilizados para su nombramiento (Encured , 2013)

- Bicromato de Potasio
- Sal dipotásica del ácido crómico

5.6.2.8. Propiedades físicas:

Tomadas de la Hoja de seguridad para el manejo de Dicromato de Potasio (2013) tenemos:

- Punto de Ebullición: Se descompone a 500 °C
- Punto de fusión: 398 °C
- Densidad (a 25 °C respecto al agua a 4 °C): 2.676
- Calor de fusión: 29.8 cal/g
- Calor de disolución: -62.5 cal/g
- Solubilidad: soluble en agua : una disolución saturada a 0 °C, contiene 4.3 %; a 20 °C, 11.7 %; a 40 °C, 20.9 %; a 60 °C, 31.3 %; a 80 °C, 42 % y a 100 °C, 50.2 %.
- Una disolución acuosa al 1% tiene un pH de 4.04 y una al 10 % de 3.57.

5.6.2.9. Números de identificación:

- CAS: 7778-50-9 STCC: 4941160
- N Au : 1479 RTECS:HX7680000
- NIOSH: HX 7680000 El producto está incluido en: CERCLA.NOAA: 4305
MARCAJE: OXIDANTE

5.6.2.10. Aplicación

El dicromato de potasio tiene una gran diversidad de usos dentro de los cuales se pueden encontrar: (MSDS, 2013)

- Es utilizado en la producción de productos pirotécnicos y explosivos.
- El dicromato de potasio se utiliza en la galvanotecnia para cromar otros metales
- Como colorantes.
- En productos para Impresión.
- Para curtido de pieles.
- En la fabricación de telas repelentes al agua.
- En la fabricación de bacterias eléctricas.
- Como oxidante en la elaboración de otros productos químicos orgánicos.
- En la elaboración de cerillos de seguridad.
- Como inhibidor de corrosión.
- En el blanqueo de aceite de palma, ceras y esponjas.
- En los laboratorios como reactivo analítico.
- En la industria de la cerámica.
- En la obtención de pigmentos

5.6.2.11. Manejo:

Para el manejo de este producto debe utilizarse equipo de protección personal como: bata, lentes de seguridad y guantes, en un área bien ventilada. No usar lentes de contacto al trabajar con este producto. Al trasladar el compuesto diluido, emplear pipetas, NUNCA ASPIRAR CON LA BOCA.

5.6.2.12. Toxicidad

El dicromato de potasio es tóxico. Al estar en contacto con la piel produce sensibilización y puede provocar alergias. Del mismo modo que los cromatos y los dicromatos son cancerígenos. Llegan al núcleo de la célula al ser confundidos por los canales iónicos con el sulfato en el cuerpo. Lugar donde son reducidos por la materia orgánica presente y el cromo (III) formado ataca a la molécula de ADN, según lo expuesto en (Wikipedia, 2014)

Los Residuos que contienen dicromato de potasio pueden ser tratados con sulfato de hierro (II) (FeSO_4). Actúa reduciendo el cromo (VI) a cromo (III) que precipita en forma del hidróxido o del óxido.

También se utiliza en la realización de copias fotográficas, en la técnica denominada goma bicromatada, inventada en 1839, y muy empleada por el movimiento fotográfico llamado pictorialista hasta 1950.

5.6.2.13. Niveles de toxicidad:

Datos extraídos de la Hoja de seguridad para el manejo de Dicromato de Potasio (MSDS, 2013) tenemos:

- RQ: 10
- LD_{Lo} (oral en humanos): 26 mg/Kg
- LD_{50} : (oral en ratones): 190 mg/Kg.

5.6.2.14. Riesgos:

Riesgos de fuego y explosión:

Este producto no es inflamable, pero puede causar fuego al entrar en contacto con materiales combustibles. Se descompone generando oxígeno.

Riesgos a la salud:

El principal problema de este producto es su capacidad para corroer e irritar piel, ojos, membranas mucosas y tracto respiratorio, así como hígado y riñones, por lo que es peligroso inhalado, ingerido o por contacto con la piel. Se ha informado de efectos tóxicos de este producto sobre los sistemas circulatorio y nervioso central, pulmones, corazón, riñones y tracto gastrointestinal de conejos expuestos a concentraciones crónicas.

Los síntomas de intoxicación por exposición a este compuesto son: sensación de quemadura, tos, respiraciones cortas, dolor de cabeza, náusea, vómito. Además, puede presentarse erosión y decoloración de los dientes, nefritis e inflamación y ulceración del tracto gastrointestinal.

- Inhalación: Inicialmente, provoca ulceración de la nariz, después espasmos, inflamación y edema de laringe y bronquios, generando neumonitis química y edema pulmonar lo que, finalmente, provoca la muerte.
- Contacto con ojos: Causa quemaduras serias.
- Contacto con la piel: Un uso constante de este producto sin la debida protección, causa irritación, inflamación, ulceraciones y, finalmente, dermatitis. Se ha informado que el contacto de la piel con concentraciones grandes de cromatos provoca trastornos en los riñones, sin que se hayan encontrado casos de cáncer.
- Ingestión: Los efectos de una intoxicación aguda son: decoloración dental, náusea, vómito, diarrea y choque cardiovascular debido a pérdida de sangre por el tracto gastrointestinal.

En el caso de dosis muy altas (1.5-10 g), se presenta gastroenteritis aguda, hematopoyesis, edema cerebral y de pulmones y daño a hígado y riñones, lo que provoca la muerte, finalmente.

- Carcinogenicidad: Se ha relacionado a este producto con cáncer de pulmón y en diversos documentos, se considera como carcinógeno. Sin embargo, en estudios con animales de laboratorio no se ha demostrado la carcinogenicidad del cromato de calcio y otros compuestos insolubles relacionados.

- Mutagenicidad: Provoca aberraciones cromosomales e incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de células de mamíferos. También se obtuvieron resultados positivos en ensayos con *Bacillus Subtilis*.
- Peligros reproductivos: Se ha informado de una alta incidencia de complicaciones en mujeres embarazadas involucradas con el manejo de dicromato de potasio y se ha encontrado este producto dentro de la placenta y en la leche materna.

5.6.2.15. Acciones de emergencia: (MSDS, 2013)

Primeros auxilios:

- Inhalación: Trasladar a la víctima a un área bien ventilada. Si no respira, proporcionar respiración artificial y si lo hace con dificultad, dar oxígeno.
- Ojos: Lavarlos inmediatamente con agua en abundancia, asegurándose de abrir perfectamente los párpados.
- Piel: Lavar con agua en abundancia y, si es necesario, eliminar la ropa contaminada. Tratar como quemaduras producidas por ácidos. Las lesiones externas pueden neutralizarse con una disolución al 2 % de tiosulfato de sodio, después de lavar con agua.
- Ingestión: Lavar la boca con agua. Dar a la víctima a beber agua o leche y no inducir el vómito.
- En todos los casos de exposición, el paciente debe ser transportado al hospital tan pronto como sea posible.

Control de fuego:

- Este producto no es inflamable, por lo que el extinguidor a utilizarse en un incendio donde se encuentre involucrado, dependerá del material que se esté incendiando.

Fugas y derrames:

- Utilizar el equipo de seguridad necesario como bata, lentes de seguridad y guantes químicamente resistentes

- Mantenga el material alejado de drenajes y fuentes de agua mediante diques, los cuales pueden construirse con arena.
- Si el producto derramado es sólido, cubrirlo para evitar que se moje.
- Almacenar el material derramado sólido o líquido, absorbido en arena, en lugares seguros para ser tratados posteriormente de manera adecuada.

Desechos:

- Acidular la disolución o suspensión que contiene a este compuesto con ácido sulfúrico diluido hasta pH 2.
- Agregar lentamente una disolución al 50 % de bisulfito de sodio, un aumento de temperatura indica que la reacción de reducción se está llevando a cabo. Si esto no sucediera, agregar más ácido cuidadosamente.
- Posteriormente, ajustar el pH a 7 y agregar una disolución de sulfuros para precipitar el sulfuro de cromo, el cual se mandará a confinamiento. A la disolución resultante se le elimina el exceso de sulfuros (con disolución de NaOCl), se filtra, se neutraliza y se desecha al drenaje.

5.7. ¿QUÉ ES LA ECOTOXICOLOGÍA?

El vocablo Ecotoxicología fue planteado por Truhaut en 1969, como una extensión natural de la Toxicología concerniente al estudio de los efectos de los agentes tóxicos, causados por contaminantes naturales o sintéticos a los constituyentes del ecosistema, en un contexto integral, refiriéndose a dos efectos ecológicos importantes de los contaminantes:

- La toxicidad directa sobre los organismos
- Las alteraciones del medio ambiente en el cual viven los organismos.

Esta disciplina se encarga del estudio de los efectos adversos de las sustancias en los ecosistemas, mediante el análisis de las rutas de exposición, la entrada al organismo y efectos nocivos en individuos, poblaciones y comunidades.

La ecotoxicología se diferencia de la toxicología convencional, en que, en la primera los efectos importantes son los que afectan a las poblaciones y no a los individuos. Desde el punto de vista ecotoxicológico, el hecho de que un contaminante pueda matar al 50% de los individuos de una población puede representar poco o nada, pero si ese contaminante retrasa el desarrollo de un significativo número de individuos presentaría importantes cambios ecológicos. Del mismo modo, si un contaminante cambia las condiciones del hábitat de los organismos, las consecuencias ecológicas pueden ser de mayor importancia a considerar.

De acuerdo a la página del INECC (2009) se puede decir que:

“La ecotoxicología se encarga del estudio de las relaciones directas e indirectas entre las causas, los impactos sobre los individuos y las alteraciones finales sobre las poblaciones y las comunidades.”

La finalidad de la ecotoxicología aplicada en cuanto a lo expuesto por Maldonado (2008, p. 5), es el desarrollo de protocolos de ensayo para ser empleados como herramientas de predicción tempranas que den pautas para definir indicadores de toxicidad que serán utilizadas para la evaluación de los riesgos que pueda implicar la liberación al ambiente de productos químicos potencialmente peligrosos.

Actualmente se han diseñados modelos de ecosistemas para todos los ambientes (acuático, terrestre, aéreo y sus combinaciones) y el éxito de las evaluaciones de Seguridad Ambiental de un producto o vertido estriba en escoger el modelo adecuado, crear condiciones similares a las naturales, y utilizar especies naturalmente afectadas o de alta sensibilidad.

5.7.1. ¿QUÉ TIPO DE EFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS PUEDEN MEDIRSE?

Por ahora la ecotoxicología se vale de dos herramientas básicas para realizar sus investigaciones consideradas como las más importantes: el monitoreo ambiental y el monitoreo biológico.

- El monitoreo ambiental establece las formas mediante las cuales se liberan los compuestos y determina cuál es su destino en el ambiente. Es una manera empleada para mostrar la presencia y cuantificar las concentraciones de los contaminantes en los diferentes compartimentos, incluyendo al aire, agua, suelo y sedimentos. Para un monitoreo ambiental se debe tener en consideración un muestreo representativo, técnicas adecuadas para la recolección y preservación de las muestras, también indica métodos adecuados de extracción y análisis, siguiendo prácticas estandarizadas en el laboratorio. El monitoreo ambiental recurre a varias técnicas de diagnóstico, complementarias entre sí, como lo son: monitoreo de efectos biológicos con ensayos de toxicidad, monitoreo biológico de campo y medición de parámetros químicos convencionales en descargas y cuerpos receptores debido a que las sustancias potencialmente tóxicas pueden encontrarse en concentraciones tan bajas, o en condiciones ambientales tales, que son indetectables con los métodos químicos convencionales, (Paggi & de Paggi).
- El monitoreo biológico, desde la perspectiva de la ecotoxicología, se encarga de evaluar los efectos negativos de los contaminantes sobre los individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas que han estado expuestos. Por lo tanto, se pueden aplicar pruebas en el laboratorio o realizar estudios en campo.

Las pruebas en el laboratorio involucran la administración de un compuesto como tal a una población de una especie particular en condiciones controladas, la población en estudio es aislada de las interacciones con otros organismos, compuestos y factores ambientales, utilizando un sistema simplificado que nos permite conocer con mayor facilidad los efectos atribuibles a una sustancia. Pero debido a las condiciones que se presentan en la naturaleza no es fácil extrapolar los resultados obtenidos. Se puede alcanzar una mayor aproximación de estas pruebas en condiciones reales si los organismos son expuestos a muestras ambientales o extractos de las mismas.

En los estudios de campo se valoran los impactos de los contaminantes sobre los organismos representativos de diversos niveles tróficos en el ecosistema, bajo las

condiciones reales del medio ambiente. Las consecuencias de todas las sustancias presentes y sus interacciones aditivas, son consideradas como sinérgicas o antagonicas, así como los efectos de los factores climáticos y abióticos, tales como la temperatura, pH, contenido de oxígeno, humedad, aireación, salinidad, radiación solar, etc.

En estos ensayos se miden los cambios en las poblaciones que se alejan de la normalidad; sin embargo, en muchos casos se dificulta saber con exactitud cuál es la variación natural presente en estas poblaciones, tanto en el espacio como en el tiempo. Entre las respuestas a evaluarse en los estudios de campo se encuentran: la reducción en la productividad o generación de biomasa, la disminución de la abundancia y distribución de especies, los cambios en la estructura trófica, etc.

La ecotoxicidad es el resultado de todo el estrés tóxico que ejercen sobre el ambiente. El uso de los métodos de evaluación biológica para detectar compuestos potencialmente dañinos comenzó a desarrollarse en los años '70, (Puig, 2010).

En la siguiente figura se muestra el orden de respuesta hacia los contaminantes:

FIGURA N° 7

Orden de respuesta al estrés contaminante



Fuente: (INECC, 2009)

5.8. BIOMAGNIFICACIÓN

La biomagnificación es considerada como una alteración que perjudica considerablemente el desarrollo normal de los seres con vida en ecosistemas acuáticos y terrestres. Razón por la cual, actualmente se trabaja en la búsqueda de métodos para regular la introducción de contaminantes a sistemas hídricos, como metales pesados, y así evitar peligrosas enfermedades en el humano.

El ingreso de contaminantes se da generalmente por parte de las industrias mineras y de refinerías de petróleo, cuyas descargas y emisiones de efluentes hacia los sistemas hídricos, causan alteración al ecosistema, originándose la bioacumulación de metales pesados y tóxicos contaminantes por parte de organismos acuáticos. Debido a que estos contaminantes son hidrofóbicos, es decir, tienden a acumularse en el tejido adiposo de los animales. (Wikipedia, 2013)

Cuando el organismo que ha acumulado contaminantes es depredado, su predador ingiere los contaminantes existentes en su alimento, por lo cual se concentra en mayor cantidad en él. Es así como al escalar la red trófica, los consumidores en el último nivel presentan concentración más elevada de metales pesados.

Un ejemplo de la biomagnificación de metales pesados se puede indicar con el Mercurio el cual no es encontrado de forma natural en los alimentos, pero este puede aparecer en la comida así como ser expandido en las cadenas alimentarias por pequeños organismos que son consumidos por los humanos, como los peces. Las concentraciones de Mercurio en los peces usualmente exceden en gran medida las concentraciones en el agua donde viven. Los productos de la cría de ganado pueden también contener eminentes cantidades de Mercurio. El Mercurio no es comúnmente encontrado en plantas, pero este puede entrar en los cuerpos humanos a través de vegetales y otros cultivos, mediante productos agrícolas; este mismo efecto puede darse por acumulación de cualquier otro metal.

5.9. ¿QUÉ ES UN BIOMARCADOR?

De acuerdo a lo recuperado del artículo expuesto por el INECC (2009) da la siguiente definición:

Es un indicador bioquímico, fisiológico o ecológico del estrés físico, químico o biológico en los organismos y sus poblaciones, considerado como un trazador de las reacciones que pueden ocurrir a diferentes niveles como: molecular, celular, en el organismo completo, las poblaciones o comunidades. Su detección permite evaluar de forma temprana los efectos negativos de los contaminantes.

En la siguiente tabla se exponen varios ejemplos de biomarcadores, medidos por diferentes niveles biológicos:

TABLA N° 7

Ejemplos de biomarcadores, medidos a diferentes niveles biológicos

Nivel de organización	Respuesta
Molecular	Expresión de genes de estrés, usando genes reporteros como el gen de la lucifererasa que produce una proteína luminiscente ante la exposición a un contaminante.
Celular	Incremento en la actividad de proteínas indicadoras de estrés o enzimas involucradas en los procesos de detoxificación.
Organismo completo	Daños histológicos o formación de tumores
Poblaciones	Tasas de supervivencia, crecimiento y mortalidad
Comunidades	Cambios en la diversidad y abundancia de especies

Fuente: (INECC, 2009)

5.10. BIOINDICADORES = INDICADORES BIOLÓGICOS

Los indicadores biológicos son atributos de los sistemas biológicos que se emplean para descifrar factores de su ambiente (Puig, 2010). Al principio se emplearon especies o agrupaciones de éstas como indicadores y, consecutivamente, se empezó a emplear también caracteres de otros niveles de organización del ecosistema, como poblaciones, comunidades, etc.

Las especies indicadoras son organismos que facilitan la tarea de descifrar fenómeno o acontecimiento alguno, relacionado con el estudio de un entorno. Toda especie tiene requerimientos físicos, químicos, de estructura del hábitat y de relaciones con otras especies. Correspondiéndole a cada especie o población límites definidos de dichas condiciones ambientales entre las cuales los organismos pueden sobrevivir (límites máximos), crecer (intermedios) y reproducirse (límites más estrechos). Por lo tanto, cuando la especie en estudio, tenga menores límites de aceptación, mayor será su utilidad como indicador ecológico. Las especies bioindicadoras tienen que ser por lo tanto; abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, estudiadas a profundidad en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad. Actualmente el empleo de organismos vivos como indicadores de contaminación es técnica de gran reconocimiento.

5.11. ¿QUÉ ES UN BIOENSAYO?

Un bioensayo de toxicidad es un test el cual establece la naturaleza y la magnitud del efecto que causa un agente dado cuando los organismos se exponen a él. Específicamente para la ecotoxicología, los agentes mencionados encierran muestras ambientales de agua, suelo o sedimentos, efluentes domésticos e industriales, extractos de sedimentos o suelos contaminados, etc. Desarrollando varios bioensayos para el monitoreo ambiental y entre sus aplicaciones relevantes, tomado de INECC (2009) tenemos las siguientes:

- El establecimiento de niveles permisibles de los contaminantes que son liberados al ambiente.
- El establecimiento de sitios prioritarios que requieran acciones de limpieza.
- La determinación de impactos ambientales mediante el uso de organismos biomarcadores.
- La evaluación y predicción del efecto de nuevos productos químicos en el ambiente.

- Los estudios de biodisponibilidad y bioconcentración de contaminantes.
- La comparación de la sensibilidad de varias especies de organismos a un compuesto dado.
- La evaluación de la efectividad de los sistemas de tratamiento de agua y el establecimiento de las condiciones óptimas de operación de las plantas tratadoras.
- La evaluación de la eficiencia de los métodos de remediación de suelos.

5.11.1. BIOENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS GENERALIDADES

Los bioensayos de toxicidad son procesos de laboratorio utilizados para la evaluación de efectos tóxicos potenciales de contaminantes químicos, efluentes industriales, o muestras de agua de un cuerpo receptor en biomodelos sensibles. Entre las especies más utilizadas propuestas por (TOXIMED) se tiene el siguiente listado:

- Fitoplancton (*Chlorellavulgaris*)
- Zooplancton: microcrustáceos de agua dulce (*Daphniaspp*)
microcrustáceos marinos (*Artemia salina*)
especies de hidrozooos y rotíferos
- Peces de agua dulce (*Brachidariorerio, Poeciliareticulata*)
- Plantas terrestres (*Lactuca sativa*)

Los ensayos de toxicidad son pruebas diseñadas para evaluar la potencia relativa de una agente o una sustancia contaminante sobre una o más especies de organismos de los sistemas biológicos acuáticos y terrestres, al tiempo que permiten caracterizar la relación concentración-respuesta entre el agente contaminante y el organismo sometido a prueba. (Escobar & Londoño, 2009).

La toxicidad de una sustancia es la propiedad que posee de perjudicar a la salud humana o la muerte de un organismo vivo, por medio de comparar el efecto de los organismos con el de una solución estándar.

Los resultados de las pruebas de ecotoxicidad forman un criterio significativo en la determinación del efecto y riesgo de la descarga de contaminantes sobre ecosistemas, también se establecen valores límites permisibles para el control de sustancias tóxicas que son vertidas a los ecosistemas acuáticos.

Con el apogeo de la ecotoxicología, se ha reforzado la idea de realizar monitoreos y pruebas de toxicidad para la detección, predicción y control de los efectos de diferentes tipos de sustancias sobre los ecosistemas, en particular, el acuático. (Escobar & Londoño, 2009)

Los bioensayos con especies experimentales selectas, representantes de comunidades biológicas de los ambientes considerados se utilizan en la actualidad para determinar efectos tóxicos y genotóxicos. (Mayorga, 2001). Entre los organismos empleados para realizar bioensayos, se enuncian varias especies como: bacterias; algas levaduras; hongos; plantas; nematodos; lombrices de tierra; moluscos; crustáceos; insectos; peces; ranas y mamíferos (ratones, ratas, cobayos, conejos y otros).

La evaluación de riesgo ecotoxicológico permite estimar la probabilidad de que se produzca un efecto ecológico adverso como resultado de la exposición a uno o más factores causantes de estrés (“*stressors*”) (UNSAM, 2009). Dichos factores pueden ser físicos, químicos o biológicos. En la evaluación de riesgo se debe tomar en cuenta los efectos de los factores sobre organismos de variadas especies diferentes, y sobre poblaciones, comunidades y ecosistemas también.

Las actividades humanas generan ciertos impactos sobre la comunidad en un ecosistema manifestándose esencialmente en la alteración de proporciones entre los individuos de las diferentes especies pertenecientes a las condiciones antes de la contaminación, debida a la desaparición de algunas de ellas, el descenso significativo

de sus abundancias o por el aumento de otras, importante también. Reconociendo que generalmente la diversidad disminuye a causa de la contaminación.

El ambiente está formado complejamente por distintos compartimentos, aire, agua, suelo, sedimento y biota. Los contaminantes (sustancias aisladas o mezclas químicas complejas) son distribuidos según sus propiedades entre los distintos elementos. Produciendo un intercambio de las sustancias entre los distintos compartimentos. Y por lo referido en (UNSAM, 2009), estas sustancias y productos pueden causar efectos nocivos sobre los seres vivos del ecosistema.

5.11.2. TIPOS DE BIOENSAYO SEGÚN SU TÉCNICA

A continuación en la siguiente tabla se resumen los diversos tipos de bioensayos de acuerdo a la técnica empleada.

TABLA N° 8

Tipos de bioensayo

Ensayos estáticos	Este consiste en colocar en cámaras de prueba o montajes las soluciones que se vayan a utilizar en el ensayo y los organismos que se van a examinar. En estos ensayos, las soluciones siempre son las mismas.
Ensayos Semi-estáticos:	En ellos se renueva periódicamente el medio de ensayo (ejemplo: una vez cada 24 horas).
Ensayos de flujo continuo:	En los que existe una renovación continua del medio de ensayo.
Ensayos de reproducción:	El periodo de exposición, cubre al menos tres generaciones de los organismos prueba. Permiten evaluar el comportamiento reproductivo como consecuencia de la exposición al tóxico.
Ensayos de recuperación:	En los que el periodo de exposición es seguido por la transferencia y observación de los organismos de prueba en un medio no tóxico.

Fuente: (SUTER, Londres, págs. 115-132)

Elaborado por: (López, 2009)

5.11.3. CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS EN LOS BIOENSAYOS

Los resultados de los ensayos de toxicidad pueden ser evaluados de acuerdo a lo citado por López (2009) por los siguientes modos:

- a) **Interpretación:** la muerte, crecimiento reproducción son algunos de los parámetros usados para medir los efectos de un tóxico sobre un organismo, se esperan correspondan a los efectos observados en un ecosistema, cuando se asumen que la concentración de tóxico en el ambiente es comparable con la de las pruebas realizadas en el laboratorio. Aunque es imposible reproducir exactamente todas las condiciones que hay en un ecosistema, con los resultados obtenidos se asume se pueda predecir los efectos en un ecosistema.
- b) **Extrapolación:** hace referencia a un criterio basado en los resultados obtenidos en las pruebas, y que puede predecir el peligro ambiental que cause un contaminante. Para un químico en particular este criterio está relacionado con la sensibilidad de especies de importancia económica, usualmente peces.
- c) **Sensibilidad:** la sensibilidad de la respuesta está sujeta al nivel de organización biológica del organismo de prueba, la duración de la prueba, y a la variabilidad de la respuesta. La sensibilidad de un sistema biológico a la acción de un tóxico se da en todos los ecosistemas, pero hay especies estándar con una alta sensibilidad a diferentes tóxicos, que son ampliamente utilizadas en ensayos de toxicidad, por esta razón. De la forma en que se realicen los ensayos de toxicidad, los resultados podrán tener una alta correlación con los efectos adversos observables en un ecosistema.
- d) **Variabilidad:** la determinación de una variabilidad que sea aceptable, es una cuestión metodológica y estadística. Sin embargo, esta es inherente a la medición de la respuesta, y al número de unidades experimentales. Es por eso que la metodología utilizada en los ensayos de toxicidad debe ajustarse correctamente para que las variaciones no sean significativas.

- e) **Replicabilidad:** existe técnicas toxicológicas estandarizadas con especies de prueba debidamente reconocidas, que han sido publicadas para asegurar que los datos obtenidos sean completamente reproducibles en otros laboratorios. Sin embargo, como no en todos los laboratorios pueden aplicarse estas metodologías, para evitar variabilidad en los resultados.

5.11.4. SIGNIFICADO ECOLÓGICO DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

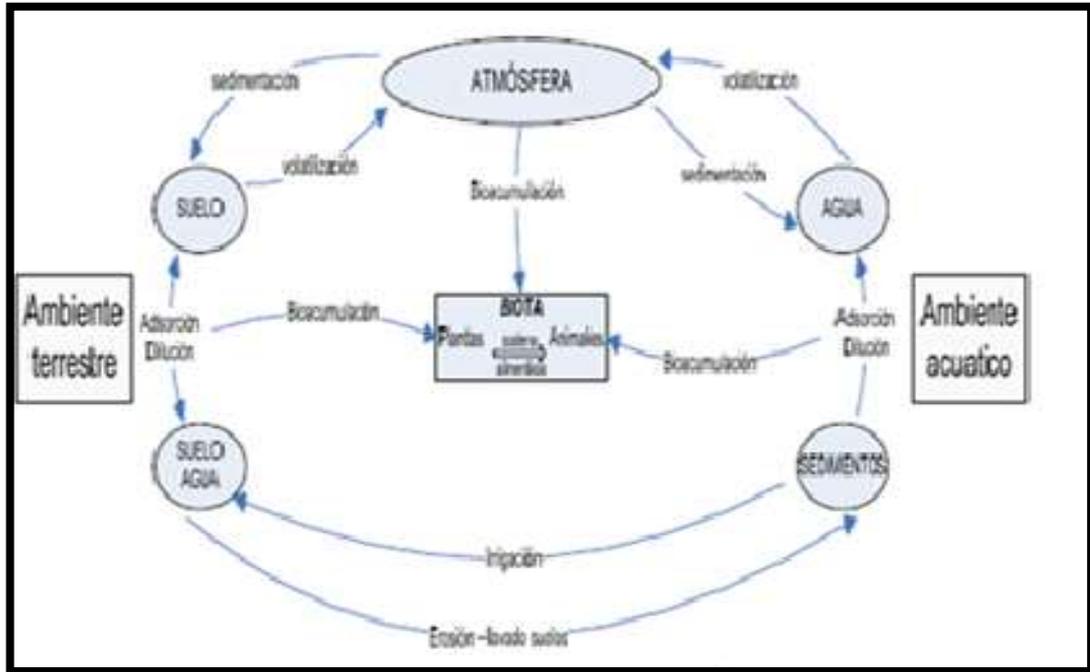
En un ecosistema, se da un ciclo continuo de factores esenciales y una interacción de dichos elementos con otros compuestos presentes en el entorno. Esta interacción asigna un grado de control homeostático asegurando la biomasa mantenida en un máximo. Cada una de las propiedades del ecosistema, se pueden alterar por un contaminante ambiental; y los efectos de esta alteración, pueden manifestarse en la tasa de producción primaria, o en la respiración.

El peligro de que un compuesto sea tóxico y permanezca estable en el ambiente, depende de la posibilidad de expandirse hacia la biota y la disponibilidad que posea. Por ejemplo un agente químico tóxico, que llega al suelo, agua, atmósfera o a la biota puede moverse por diversas vías (transferencia biológica o física) entre los ecosistemas.

Los procesos de adsorción, excreción, alimentación, contribuyen en el traspaso de un agente tóxico. La acumulación en los organismos del tóxico, dependen de la velocidad de cada proceso, efecto llamado bioacumulación. Y la biomagnificación es el fenómeno es cuando se produce un incremento del contaminante durante la cadena alimenticia. En la figura 8 se puede observar el mecanismo de los fenómenos mencionados.

FIGURA N° 8

Mecanismo de transporte de un contaminante químico en el ambiente



Fuente: (Hoyos, 1995)

Dentro de un organismo pueden acumularse niveles tóxicos de contaminantes químicos considerados como inofensivos en el ambiente, debido a la bioacumulación. La exposición eventual a una sustancia, incluso en concentraciones bajas, puede causar efectos crónicos los organismos y efectos acumulativos en poblaciones. Para determinar el riesgo potencial de un contaminante, se toma en cuenta la persistencia en el ambiente de una sustancia, ya que influye en los procesos de bioacumulación o biomagnificación, ayudando también en su dispersión.

La información sobre la muerte de organismos, acumulación en tejidos, daño a nivel reproductivo, mutagenicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad y alta susceptibilidad a cambios en el ambiente es obtenida mediante los resultados de las pruebas de toxicidad,

En un organismo en particular los efectos tóxicos que se puedan presentar tienen mucha importancia, ya que se puede originar, la reducción de una especie, se puede modificar el tamaño de la población, causado por las interrelaciones alteradas entre

los distintos niveles tróficos. Incluso si se perturba a una especie con importancia relevante, se modificaría el ecosistema en su totalidad.

Por lo tanto la calidad del ambiente acuático aparte de ser valorada por los análisis químicos comunes también puede ser valorada por la vigilancia de las comunidades de plantas y animales.

Los bioensayos en investigación relacionados con la contaminación se los considera como herramientas no solo para determinar el efecto de una sustancia en un organismo, sino para la preservación de diferentes especies de importancia para el ecosistema, y protección de la estructura y función del ecosistema, la predicción de la consecuencia ecológica del contaminante, el riesgo potencial de la sustancia para otros organismos superiores y el límite en el que ella puede llegar a un ecosistema sin causar daños en él, son también elementos de evaluación con las pruebas de toxicidad, (Hoyos, 1995).

5.12. MODELOS BIOLÓGICOS

Un organismo modelo en biología es una especie muy estudiada para entender fenómenos particulares, que puedan explicarnos cómo funcionan diversos procesos en otros organismos. Particularmente, los organismos modelos son muy empleados para analizar las causas de enfermedades humanas y posibles tratamientos ya que la experimentación aplicada en humanos es contraria a la bioética. Esta táctica ha sido posible seguirla debido a la relación evolutiva de todos los organismos con vida (la descendencia de un ancestro común) que comparten diversos mecanismos metabólicos, material genético y mecanismos del desarrollo biológico.

5.12.1. ARTEMIA SALINA

FIGURA N° 9

Imágenes de la Artemia salina



Fuente: (Naturephoto)y (Blogueiros, 2010)

Elaborado por: Autores de la Tesis

5.12.1.1. Características

Las Artemias son crustáceos muy pequeños, mide, entre 1 (a veces algo menos) y 1,5 cm, según la edad y las condiciones ambientales. Sin embargo, existen Artemias mucho más pequeños como la Artemia partenogenética que mide unos 3 mm de longitud.

Las Artemias viven en aguas salobres, en algunos casos en aguas muy saladas, de hasta más de 330 gr de sal por litro de agua dulce, no obstante, también pueden vivir en aguas prácticamente dulces. La salinidad del agua es uno de los factores ambientales que influyen en el crecimiento de las Artemias, a menores índices de salinidad del agua se ha visto que las Artemias que viven en ellas tienen mayor tamaño que aquellas que viven en aguas más saladas.

Las Artemias viven en aguas salobres del continente, como lagunas, lagos (endorreicos) o salinas, pero no en los mares ni en los océanos. Las Artemias son animales con una gran capacidad de colonizar los ambientes más inhóspitos, como por ejemplo, charcos con poca agua que se secan rápidamente. De hecho, la mayoría de especies de Artemia viven en las zonas secas del planeta se adaptan a vivir en zonas

donde la vida es difícil para evitar el acoso de los depredadores, peces sobre todo. Las Artemias han desarrollado la formación de quistes como mecanismos de supervivencia a los ambientes a veces tan hostiles en los que viven, las Artemias tienen una gran capacidad de tolerar niveles elevados de salinidad, porque tienen sistemas para regular la presión osmótica de su cuerpo. Estos crustáceos diminutos pueden vivir en ambientes poco oxigenados, como consecuencia de la gran salinidad de las aguas donde viven, ya que se aumenta la síntesis de hemoglobina (la proteína responsable de transportar el oxígeno en la sangre hasta los tejidos del cuerpo) como respuesta al incremento de la salinidad del agua. La *Artemia parthenogenetica* es especialmente resistente a las hostilidades del medio.

En las Artemias es frecuente hablar de endemismos, puesto que existen especies que viven en zonas muy restringidas y concretas del mundo. Un ejemplo de ello es la *Artemia monica* que solamente existe en un lago californiano, el Lago Mono, de ahí su nombre científico o la *Artemia persimili*, propia de Argentina.

Las Artemias son tremendamente abundantes en los pequeños espacios que han escogido para vivir, ya que son pocos los animales que pueden tolerar tan bien las grandes valoraciones que sufren los ambientes donde viven las Artemias, también hay Artemias que tienen una gran área de distribución, como la *Artemia franciscana*, que vive en todo el mundo, excepto en la Antártida; el único continente donde es imposible encontrar a este crustáceo. Originalmente, esta especie de *Artemia* vivía solamente en América.

Las Artemias tienen fototropismo positivo, o lo que es lo mismo, sienten atracción a la luz como las plantas. Esta propiedad se percibe en las Artemias cuando al iluminar una zona concreta del recipiente donde viven las Artemias se dirigen a ellas nadando de una forma muy curiosa, de espaldas. Siendo esta la forma normal de nadar de mencionados crustáceos siguiendo trayectorias rectas que solo abandonarían cuando algo les asuste, en cuyo caso cambian de forma brusca de recorrido. También es común que estos animales naden a contra corriente.

TABLA N° 9

Características de la Artemia salina

Orden	Familia	Longitud	Longevidad	Habitad	Distribución	Alimentación
Anostraca	Artemiidae	Entre 1 y 1,5 cm	Menos de un año	Lagunas y lagos salados y salinas	Sur de España, tenez, mar caspio, centro de Asia, india, Australia, Groenlandia, EEUU.	Filtradora no selectiva (<i>Microalgas</i> , <i>Rotíferos</i> y Detritos).

Elaborado por: Autores de la Tesis

Fuente: (Botanical-Online, 2010)

5.12.1.2. Sobre su aspecto comportamiento:

Este pequeño crustáceo se comercializa con el extraño nombre de *sea monkeys*, y de hecho tiene su explicación puesto que así son llamadas las Artemias en inglés, también conocida como *brine shrimp*. (Botanical Online, 2010). A las Artemias se las ha bautizado como monos de mar no por sus semejanzas de forma ni tamaño con los primates, sino a que se desplazan por el agua con la ayuda de su larga cola parecido al acto que hacen los auténticos monos de la selva entre las ramas de los árboles.

5.12.1.3. Alimentación de la Artemia

Las Artemias son animales filtradores o llamados también suspensivosos, así como lo son también varios moluscos tales como los mejillones y las ostras. Mediante la corriente que crean con el movimiento de los apéndices toraficos, los filopodos, las Artemias filtran algas unicelulares (*dunaliella*, *tetrahedron*, *chaetoceros*) rotíferos y detritos. (Botanical OnLine, 2010).

La clase de alimento que filtran las Artemias depende del tamaño, específicamente de las sedas filtradoras de los filopodos, que funcionan como un filtro genuino. Las Artemias de mayor tamaño pueden filtrar pequeños crustáceos. La solubilidad es un punto a considerar, ya que los alimentos poco solubles no son

aprovechados adecuadamente por las Artemias, debido a que estos crustáceos se nutren del alimento que encuentran disuelto en el agua.

Se pueden alimentar a las Artemias con una diversidad de ingredientes, debido a la cualidad de ser animales filtradores no selectivos.

Las Artemias que viven en la naturaleza se alimentan, de alimento vivo, como lo hemos mencionado antes, pero también de detritus y restos de materia orgánica existentes y acumulados en el fango, por lo tanto además de alimento vivo se puede complementar su nutrición con alimento inerte, aunque con su introducción al recipiente de las Artemias se causa otro problema en la calidad del agua, dado a que esta clase de alimento ensucia más el agua que el alimento vivo.

El alimento inerte puede ser una mezcla homogénea de harina de arroz o de trigo, germen de trigo, salvado de arroz, harina de soja, yema de huevo, alga espirulina y levaduras.

5.12.1.4. Condiciones de cría de la Artemia

Condiciones tomadas de acuerdo a lo mencionado en (Botanical-Online, 2010)

tenemos los siguientes puntos:

- La temperatura óptima se encuentra entorno a los 25° C.
- El pH debe de ser básico (desde 7,5 a 8,5) y el agua donde están las Artemias es importante que se encuentre bien oxigenada.
- El agua de su medio siempre es necesario que tenga algo de sal para su supervivencia.
- Los valores de salinidad más recomendados son los cercanos a los que tiene el mar Mediterráneo, debido a que tiene una baja salinidad, comparada con la salinidad de otros medios salinos.
- Se recomienda que por cada litro de agua dulce se diluya valores no mayores a 38 gramos de sal.
- El agua empleada puede ser del grifo pero es importante que se la deje reposar un par de días para que se evapore el cloro.

Estas condiciones son importantes principalmente para que se dé una eclosión adecuada de los quistes de Artemia.

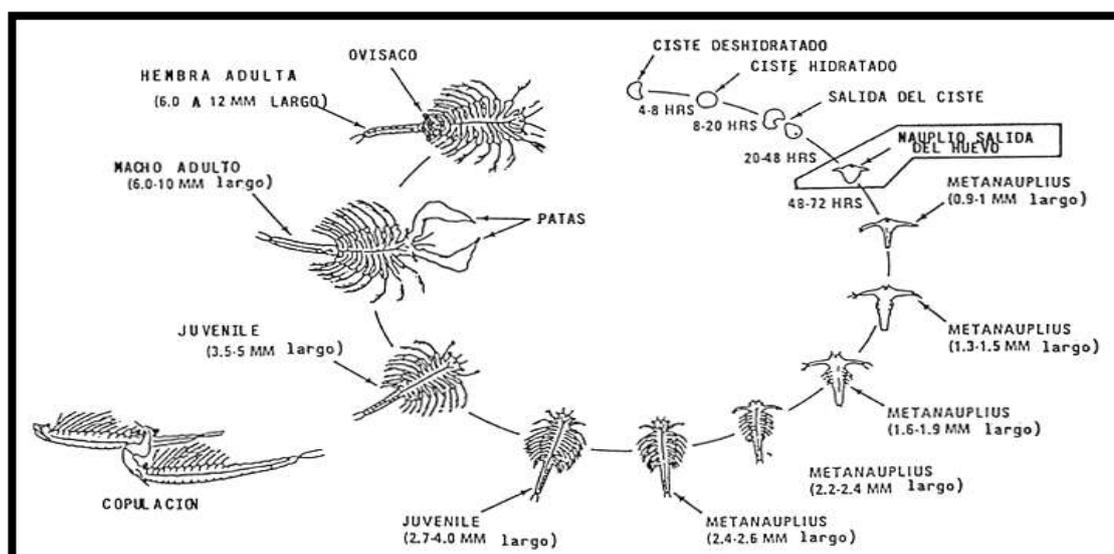
5.12.1.5. Morfología y ciclo vital:

El ciclo vital inicia con minúsculas partículas marrones (de 200 a 300 micras de diámetro) que flotan en la superficie del lago y son arrastradas hasta las orillas. Se forma un polvo inerte, que no es en realidad los quistes secos inactivos de la Artemia, en estado de criptobiosis (“durmientes”) manteniéndose así durante el tiempo que permanezcan secos.

Una vez colocados en agua salina, los quistes bicóncavos se hidratan dando una forma esférica, recuperando el embrión su metabolismo reversible interrumpido. La membrana externa de los quistes se rompe (“breaking”) después de unas 24 horas apareciendo el embrión rodeado por la membrana de eclosión. En las siguientes horas, el embrión abandona totalmente la cáscara del quiste: colgando mientras tanto de la cápsula vacía la cual persiste todavía unido (estado de “umbrella”). Completándose el desarrollo del nauplio dentro de la membrana de eclosión, comenzando a mover sus apéndices y la membrana de eclosión se rasga (“hatching”) brotando el nauplio que nada libremente en un corto periodo de tiempo.

FIGURA N ° 10

Ciclo de vida de la Artemia salina



Fuente: (FAO, 2003)

“El primer estado larvario llamado también estado I, mide entre 400 y 500 micras de longitud, tiene un color pardo anaranjado (por acumulación de reservas vitelinas) y posee tres pares de apéndices: el primer par de antenas, también llamadas anténulas y que tienen una función sensorial; el segundo par de antenas con función locomotora y filtradora; y las mandíbulas con una función de toma de alimento. Un único ocelo de color rojo también llamado ojo naupliar, se encuentra situado en la cabeza entre el primer par de antenas” expuesto y obtenido en (Portapelez Biblioteca, 2008).

La cara ventral del animal está cubierta por un labio desarrollado interviniendo en la toma de alimento, llevando las partículas desde las setas filtradoras hacia la boca. Teniendo en cuenta que el estado larvario I no se alimenta debido a que el aparato digestivo no es funcional, permaneciendo aún cerrados la boca y el ano.

Llegando a las 24 horas, el animal cambia al segundo estado larvario, llamado estado II. En el cual pequeñas partículas alimenticias con un tamaño entre 1 y 40 micras son filtradas por el segundo par de antenas, siendo ingeridas por un aparato digestivo funcional.

La larva continúa creciendo aflorando diferenciaciones durante las 15 mudas. De esta manera aparecen unos apéndices lobulares pares en la región torácica más adelante diferenciándose en toracópodos, se forman ojos complejos laterales a ambos lados del ojo naupliar. A partir del estado X en adelante, se generan cambios significativos tanto morfológicos como funcionales, por ejemplo: pérdida de la función locomotriz de las antenas transformándose en elementos de diferenciación sexual. De acuerdo a Portapelez Biblioteca (2008) se menciona que: Los futuros machos desarrollan unos apéndices curvados y prensiles mientras que las antenas de las hembras degeneran en apéndices sensoriales.

Los toracópodos formados en su totalidad presentan tres partes funcionales: los telopoditos y endopoditos con funciones tanto locomotrices y filtradoras y los exopoditos que actúan como branquias.

La fase adulta posee características como las de:

- Cuerpo alargado con dos ojos complejos pedunculados,
- Aparato digestivo lineal,
- Anténulas sensoriales y
- 11 pares de toracópodos funcionales.

En el macho se observan un par de piezas prensiles musculadas muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se puede observar un par de penes. La hembra de Artemia no tiene apéndices distintivos en la región cefálica, pero puede ser fácilmente reconocida por el saco de puesta o útero que está situado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos. (Portalpez Biblioteca, 2008).

Las hembras tienen a la base de la cola, el útero, que se ve muy engrosado.

La Artemia posee un cuerpo delgado y alargado, cubierto por un caparazón blando. Su longitud y aspecto varían de acuerdo a la población/especie (bisexuales o partenogénicas y diploides o poliploides) y según la salinidad y características fisicoquímicas del medio en que habitan.

Se pueden distinguir tres partes bien diferenciadas externamente: cabeza, tórax y abdomen.

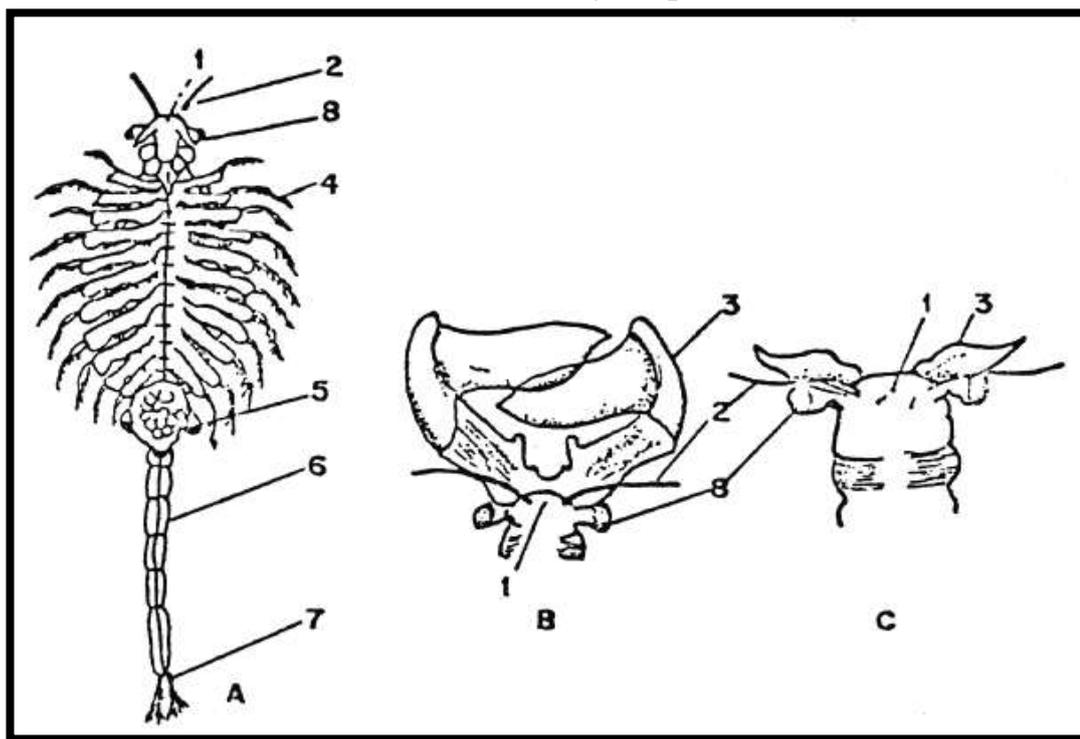
- En la cabeza se encuentran los restos del ojo naupliar, los ojos compuestos, proporcionados de largos pedúnculos de longitud y las antenas.
- El tórax presenta once secciones bien definidas, cada uno compuesto de un par de apéndices foliáceos, con función natatoria, respiratoria y filtradora de alimentos, batiendo con un ritmo metacrónico de unos 150 a 200 golpes por minuto.
- El abdomen formado por ocho segmentos ápodos. Los dos contiguos al tórax son los segmentos genitales, visiblemente más abultados que los torácicos y abdominales. Estos dos primeros están hipertrofiados en su cara ventral, dando cabida a los aparatos sexuales: bolsa ovígera o útero en las hembras y vesícula seminal y pene en los machos. El último pertenece al telson, que exhibe dos formaciones alargadas en disposición lateral

constituyendo la furca caudal, con el borde erizado de largas sedas. En la escotadura entre ambos lóbulos se abre el orificio anal.

“El aparato circulatorio está formado por un largo corazón tubular con un ostiolo en su extremo posterior y por varios senos en diversas zonas del cuerpo. A través del sistema circula hemolinfa, que contiene algunas células específicas, así como hemoglobina. La superficie respiratoria se halla directamente relacionada con la actividad locomotriz, ya que se localiza en los exopoditos de los toracópodos. En estos apéndices, la cutícula es más fina que en el resto del cuerpo y presentan en su interior un gran desarrollo de las cavidades que llena la hemolinfa, facilitando el contacto entre el medio exterior y la hemoglobina.” (Álvarez, 2002)

FIGURA N° 11

Artemia salina y sus partes



Fuente: (FAO, Departamento de Pesca, 1989)

En la figura siguiente se puede observar a la Artemia en la cual se indica cada una de sus partes de acuerdo a la simbología siguiente:

A. Hembra,	Sus partes
B. Cabeza de macho,	
C. Cabeza de hembra,	1. Ojo nauplio,
	2. Antenuelas,
	3. Antena,
	4. Apéndice torácico,
	5. Saco ovigero,
	6. Segmento abdominal,
	7. Furca,
	8. Ojo pedunculado.

5.12.1.6. Sobre su reproducción:

Las Artemias tienen un ciclo de vida anual con una reproducción bastante complicada: partenogénesis, reproducción ovípara (depósito de huevos en el medio externo) u ovovivípara (huevos permanecen dentro de la hembra).

La Artemia al alcanzar 1 cm de longitud, llegando al mes desde su eclosión, se encuentra listas para reproducirse, pues ya poseen un aparato reproductor bien formado.

Condiciones como una salinidad muy alta, en conjunto a una escasez de comida, favorece la reproducción ovípara. Los huevos producidos en dichas condiciones, pueden resistir largos periodos sin desarrollarse hasta mejorar las condiciones ambientales, es decir, hasta que el agua deja de ser considerablemente salada y el alimento sea frecuente, la temperatura se aproxime a la ideal o hasta que los quistes se rehidratan. Los quistes de Artemia resisten periodos de desecación de varios años hasta que las condiciones ambientales sean favorables.

El corion es la sustancia, producida por una glándula de la Artemia, la glándula de la cascara, que rodea a los huevos y los protege del medio ambiente. Cuanto mayor es la densidad del agua, mayor es la capa de protección del huevo y también más tiempo necesitan los huevos para eclosionar. (Botanical-Online, 2010)

Parecido a las Dafnias, las Artemias pueden radicarse en nuevos entornos en el momento que sus quistes se adhieren a las plumas o patas de las aves acuáticas o cuando son arrastrados por el viento.

Los huevos se desarrollan en dos ovarios tubulares que se encuentran en el abdomen. Ya maduros, tienen forma esférica y se trasladan al útero por dos oviductos llamados sacos laterales.

“La precópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el útero y el último par de toracópodos, con sus antenas curvadas. Las parejas pueden nadar de esta forma durante largo tiempo en lo que se conoce como posición de monta (“riding position”), para lo cual mueven sus toracópodos de forma sincrónica. La cópula es un rápido acto reflejo: La parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes es introducido en la abertura del útero fertilizando los huevos. En el caso de las hembras partenogenéticas la fertilización no tiene lugar y el desarrollo embrionario comienza tan pronto como los huevos han llegado al útero”. (BuenasTareas. com, 2011)

Los huevos fecundados, que se transforman durante el desarrollo en nauplios nadadores (reproducción ovovivípara), son depositados por la hembra. En circunstancias extremas, las glándulas de la cáscara, (parecidos a uvas situados en el útero), se activan y empiezan a acumular una secreción de color marrón (hematina). Los embriones desarrollados hasta la fase de gástrula, se ven rodeados por una gruesa cáscara (segregada por las glándulas de la cáscara), dando paso al estado de latencia o diapausa, que es la parada reversible del metabolismo embrionario, y por último son liberados por la hembra (reproducción ovípara). En condiciones aptas la *Artemia* puede vivir durante varios meses, ascendiendo de nauplio a adulto en 8 días y reproduciéndose a una tasa de hasta 300 nauplios o quistes pasando 4 días.

Existen cepas de *Artemia* que se reproducen mediante partenogénesis, sin embargo es sorprendente como la *Artemia parthenogenética* se reproduce, ya que estos individuos se reproducen casi todo el tiempo de forma partenogenética, que permite colonizar nuevos ambientes ya que produce una cantidad considerable de organismos nuevos cuya condición primordial recae en la adecuación del medio de hábitat.

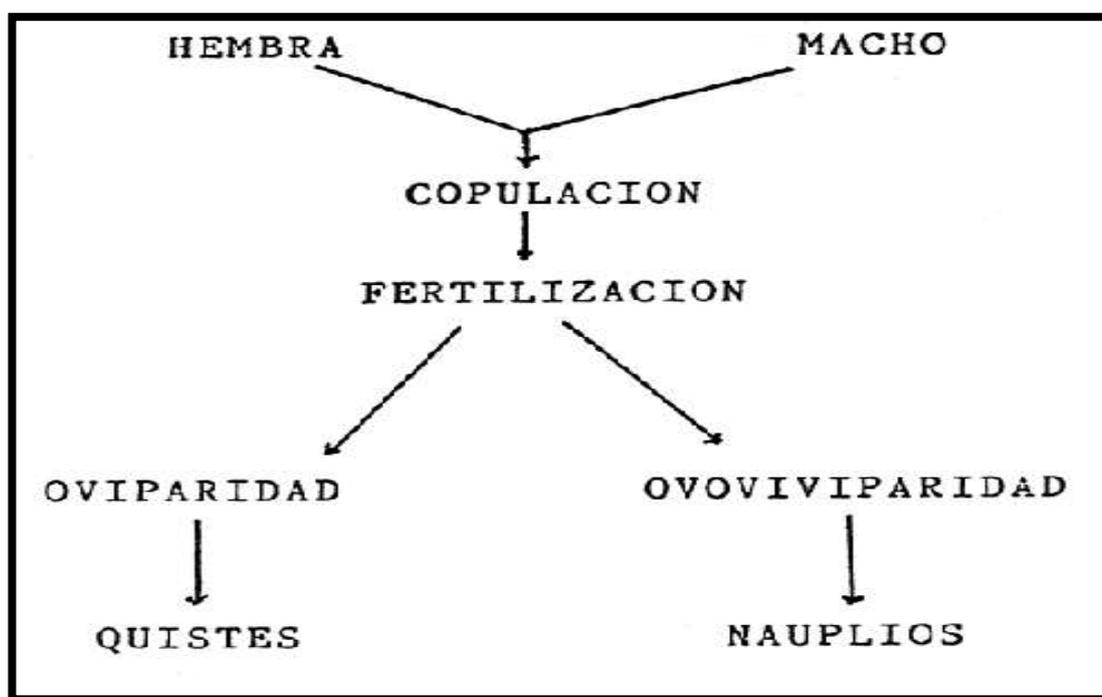
Y cuando los ambientes no reúnen las condiciones de vida para las *Artemias*, esta especie se reproduce mediante vía asexual como forma de adaptación.

Las Artemias también se pueden reproducir de forma ovovivípara, los huevos se desarrollan en la cámara de incubación de los huevos o también llamada ovisaco hasta que están totalmente desarrollados como nauplios, momento en el que se produce la liberación al agua de los nauplios de Artemia, todo esto expuesto en Botanical Online (2010).

Los machos viven menos tiempo que las Artemias hembras, siendo la esperanza de vida máxima para esta especie es aproximadamente de 1 año.

FIGURA N° 12

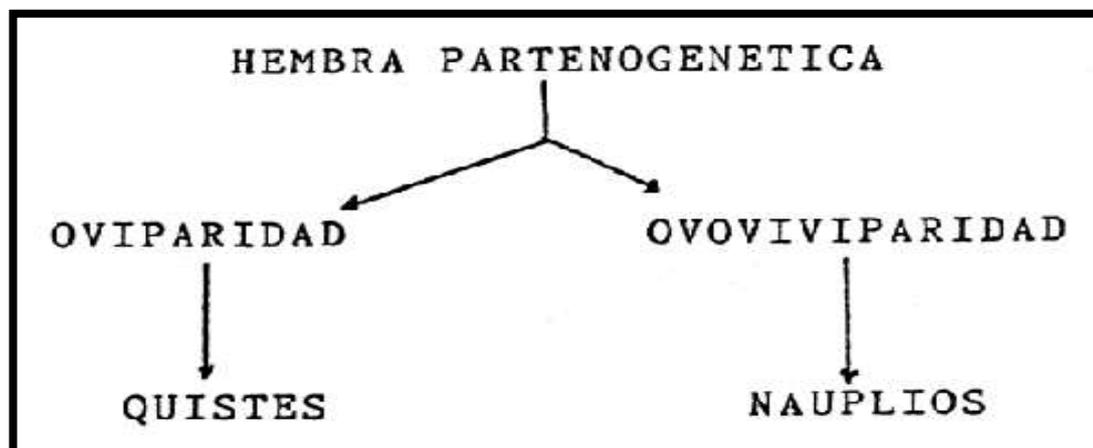
Ciclo de vida sexual de Artemia salina



Fuente: (FAO, Departamento de Pesca, 1989)

FIGURA N° 13

Ciclo de vida asexual de *Artemia salina*



Fuente: (FAO, Departamento de Pesca, 1989)

5.12.1.7. Taxonomía de la *Artemia*

La diversidad de los medios en que habita *Artemia* varía en función de la composición de aniones, las condiciones climáticas y la altitud. *Artemia* puede vivir en aguas ricas en cloruros, sulfatos o carbonatos, o en distintas combinaciones de ellos, dependiendo de qué aniones prevalezcan (Bowen, 1988) (Bowen S. T., 1985).

A pesar de que en los estudios para comprender la especiación en *Artemia* se han considerado un amplio rango de características, la filogenia del género, y sobre todo, lo que atañe a las especies más estrechamente relacionadas, no está bien establecida (Gajardo, 2001).

A partir de diversos estudios, sobre todo en las últimas décadas, la atención de los investigadores ha ido ampliándose para dar cabida, junto con los estudios aplicados por el interés de *Artemia* en acuicultura, a la investigación de los mecanismos fisiológicos y genéticos que puedan explicar los patrones ecológicos y los mecanismos evolutivos de adaptación a los diferentes medios en que habita, citado por (Álvarez, 2002).

Se considera, al género *Artemia* como uno de los sistemas biológicos con mayores expectativas para nuevos estudios sobre la naturaleza del aislamiento ecológico y el proceso de especiación.

5.12.2. LA ARTEMIA EN ENSAYOS BIOLÓGICOS

Artemia es en la actualidad, el único género animal en estado criptobiótico (quistes) existente en el mundo comercialmente accesible continuamente, lo cual constituye como razón válida para emplearla en ensayos biológico, siendo adecuadas y prácticas para un ensayo estándar por el estado criptobiótico, durante su ciclo de vida. Ofreciendo diversas ventajas por la disponibilidad permanente de huevos (quistes) obtenidos de larvas que enlista (Pino & Jorge, 2009):

- No hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente,
- Las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario,
- Se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.
- Se empleó a la Artemia salina como modelo biológico para este ensayo ya que reúne las siguientes características que se describen en la siguiente tabla.

TABLA N° 10

Comparación de las recomendaciones dadas para selección de modelo biológico y el Genero Artemia

Recomendaciones para selección de modelo biológico	Genero Artemia
Diferentes especies con un amplio rango de sensibilidad	Diferentes especies con gran variabilidad genética subyacente
Abundancia y disponibilidad	Gran cantidad de quistes recolectados disponibles presentes en el ecosistema salino
Ecológicamente relevante	Ecosistemas pobres en diversidad
Repercusión económica y comercial	Uso generalizado en acuicultura como alimento de otras especies de interés comercial
Fácil mantenimiento	Fácil cultivo y mantenimiento
Información disponible	Amplias bases de datos bibliográficas sobre Artemia en estudios ecotoxicológicos, bioquímicos entre otros

Elaborado por: Autores de la tesis.

En la siguiente Tabla pueden observarse diferentes CL_{50} calculados para diversas sustancias, observándose hay muchas variables que pueden incidir sobre la CL_{50} de un determinado producto.

TABLA N° 11

CL₅₀ para diferentes sustancias

Sustancia	Organismo Indicador	CL₅₀₋₂₄ mg/l	Referencia
Pipper eripodon	Artemia franciscana	4,43	Güette, J., Olivero, J. & Stashenko, E. (2009)
Aceites Esenciales, extracto acuoso de Croton malabo	Artemia franciscana	119,71	Jaramillo, B., Muñoz, K. & Olivero, J. (2007)
Dicromato de potasio	Artemia franciscana	12,5	Aportela, P. y González Y. (2001)
Dispersante de petroleo BP 110WD	Tetraselmis sp	2,08	Villamar, F. (1996)
Sulfato de Tetrakis Hidroximetil fosfonio	Artemia franciscana	0,25	Bartolomé y Rodríguez, (2007).
Bromuro de dodecil etil amonio	Artemia franciscana	0,48	
Cadmio	Artemia franciscana	93,3	Del Ramo, J., Diaz, J., Varo, I., Sarabia, R., Torreblanca, A. (2002),
Cadmio	Artemia persimilis	284	
Zinc	Artemia franciscana	44,8 (96h)	Brito, R, Gelabert, R. & Jimenez, J (2006)
Niquel	Artemia franciscana	5,5 (96 h)	

Elaborado por: Autores de la tesis.

Fuente: Diferentes autores anotados en la referencia.

Los compuestos de dicromatos son uno de los tóxicos de referencia y está entre los contaminantes más empleados a nivel industrial. Aunque, hasta la fecha no existe constancia de ninguna contaminación severa, ni registros de tal en las normas ambientales. Por lo tanto *Artemia* puede, potencialmente, sufrir la exposición y acumulación de cromo hexavalente como metal del compuesto en estudio.

En este contexto, creemos relevante estudiar a fondo sobre los efectos en el género *Artemia* mediante la evaluación de la respuesta letal a la exposición tóxica del compuesto de referencia en poblaciones naturales.

5.12.2.1. Descripción de los índices de vulnerabilidad de la Artemia salina expuesta a diferentes concentraciones de dicromato de potasio.

Los índices de vulnerabilidad de la Artemia salina dependen o están relacionados con las variantes experimentales en el ensayo que se describen a continuación.

- Utilizar los estadios larvales tempranos para pruebas de toxicidad aguda,
- Los huevos tienen que eclosionar bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH,
- Las larvas tienen que ser exactamente de la misma edad al inicio de cada prueba,
- Durante la prueba, la larva no debe transformarse en otro estadio con una sensibilidad diferente,
- Las pruebas deben realizarse con quistes del mismo origen geográfico,
- Las condiciones experimentales de la prueba tienen que ser definidas con gran exactitud

A parte basándose en lo que establece organizaciones como US EPA y FAO para el crecimiento e incubación de la Artemia Salina que se describen en la siguiente tabla:

TABLA N° 12**Condiciones de ensayo con Artemia Salina**

Organismo de ensayo	Artemia Salina
Color	Claro
Tamaño	Hasta 0,5 mm
Numero de individuos por placa	10
Punto Critico	mortalidad
Condiciones del ensayo	temperatura y luz estable (incubador)
Replicas	2
Volumen de Concentraciones Ensayadas	9 ml en 1 caja petri
Temperatura	25 - 28 °C
Exposicion	24 h(para laboratorio se usa diferentes longitudes posibles)
Ilumination	LUZ continua
Quimicos	solucion incial de muestra de ensayo, dilucion de agua marina de laboratorio
Instrumentos y Equipos	caja petri, vasos de precipitacion, micropipetas, incubador.

Elaborado por: Autores de la tesis.

Fuente: indicaciones de USEPA y FAO

Existen diferentes variantes experimentales ya mencionadas del procedimiento cuyas principales características que se deben tomar en cuentan se enlistan a continuación.

- Se tabulan los datos obtenidos de CL₅₀ en Artemia Salina con sus respectivos efectos adversos, los cuales servirán para futuras investigaciones.
- Los resultados de la prueba deben ser ignorados y la prueba repetida se observa que: menos del 90 % de la población control alcanza el estado adulto; más del 10 % de la población control muere o hay crecimiento microbiano excesivo en el sistema de prueba.

5.12.2.2. Prueba ecotoxicológica para el ambiente marino

Para la protección del ambiente marino, son necesarios métodos de ensayos ecotoxicológicos simples y confiables para determinar el impacto potencial sobre la biota marina de sustancias xenobióticas (Torokne, Vasdinnyei, & Asztalos, 2007).

Para la correcta implementación de regulaciones nacionales e internacionales, se necesita que los métodos toxicológicos usados sean confiables y reproducibles.

En 1984, Vanhaecke del Centro de Referencia de Artemia en Bélgica, después de una profunda revisión de la literatura científica que relacionaba el uso de este organismo en investigaciones sobre la contaminación ambiental, pusieron en marcha un ensayo estándar de toxicidad aguda (a corto plazo), conocido como ARC-TEST o ensayo del Centro de Referencia de Artemia. Se fundamentó dicho ensayo en la determinación de la LC_{50} a las 24 horas de las larvas de una cepa específica de Artemia sp. Concluyendo que esa técnica es una herramienta de gran valor como prueba en una primera evaluación para categorizar la toxicidad de productos químicos y para el ambiente marino como prueba de referencia.

5.12.3. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS ENSAYOS

La estadística desempeña un importante papel tanto para el cálculo, la planificación y ejecución de las pruebas de toxicidad, en cuanto a los resultados obtenidos participa en el análisis e interpretación.

De tal manera, el diseño experimental, el muestreo, la modelación, la recolección de datos, las pruebas y los análisis están ligados a principios estadísticos estrictos. Los métodos de análisis de los resultados bien documentados, se pueden aplicar en la mayoría de los datos obtenidos y se pueden manejar por personas que desconocen la estadística. En la mayoría de los casos el análisis de relaciones entre dos o más variables involucra, el uso de técnicas de regresión estadísticas. Al mismo tiempo es muy importante el tipo de variables a relacionar, en la selección del modelo a emplear.

Comúnmente, las variables se clasifican en cualitativas y cuantitativas, pudiéndose distinguir en el último caso entre discretas y continuas. Las cuantitativas discretas sólo pueden tomar valores pertenecientes al conjunto numérico de los enteros; las continuas toman cualquier valor en el conjunto numérico de los reales. Las variables cuantitativas pueden ser analizadas directamente mediante análisis estadísticos de regresión, en cuanto, las cualitativas se expresan cuantitativamente

antes de ser analizadas, verificando la evaluación de la mortalidad como variable, ya que ésta sólo puede tomar los estados vivo o muerto, expresada como porcentaje de muertos antes de poder ser analizadas por métodos de regresión.

Sobresaliendo finalmente, en lo que respecta al análisis de las relaciones entre la concentración de un tóxico y la respuesta o efecto de tal en la materia viva, existen aproximaciones al análisis de las relaciones en las que se pretende determinar la concentración a la cual no se visualiza un efecto nocivo del tóxico sobre el organismo o modelo biológico expuesto, o la concentración más baja a la cual se observa un efecto tóxico, llevado a cabo mediante el método de ANOVA (análisis de la varianza) o su equivalente no paramétrico.

Se denomina sujeto al agente que se aplica a un organismo o grupo de organismos en una prueba de toxicidad típica, en el que se evalúa cierta respuesta. Midiéndose la magnitud del estímulo como un peso, un volumen o una concentración. Valorando la respuesta del sujeto por medio de la cuantificación final de ciertos caracteres, el cambio de ella o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, una contracción muscular, etc.).

Diferentes dosis son empleadas para diseñar las pruebas de toxicidad, debido a que la respuesta depende directamente de la concentración aplicada. Permittedose la cuantificación de la relación entre las variables dosis y respuesta con la información obtenida de este tipo de ensayos, normalmente estas pruebas son diseñadas para la comparación de la potencia de un agente con relación a una preparación estándar o control.

La respuesta a una dosis en particular se ve alterada en mayor o menor medida por factores que no son controlados experimentalmente. Para el análisis de las relaciones cuantitativas entre la dosis y la respuesta, es necesario recurrir a modelos matemáticos que describan dicha relación, clasificándose dichos modelos de acuerdo a (Ed.Morales, 2004) en los siguientes:

- **Mecánico:** es un modelo que intenta describir un proceso basándose en postulados acerca de la mecánica de dicho proceso.

- **Empírico o descriptivo:** es un modelo que intenta describir cuantitativamente los patrones de las observaciones sin basarse en los procesos subyacentes o mecánica del proceso.
- **Determinístico:** es un modelo en el que dado un dato en particular, la predicción que se obtiene del modelo es siempre el mismo valor.
- **Probabilístico:** es un modelo en el que dado un dato en particular, la predicción que se obtiene del modelo es un valor variable.

Particularmente, para ensayos toxicológicos, los más utilizados son los de tipo empírico o descriptivo de forma rectilínea, transformando una o dos variables antes.

A continuación se describen algunos de los métodos que más se emplean para el tipo de investigación como esta:

Métodos estadísticos: empleado, para cumplir con los requerimientos de validez y precisión de las pruebas desde la planificación hasta la ejecución y, luego, el análisis de los resultados. Para seleccionar el método estadístico como fundamento, se debe escoger el más semejante a las condiciones experimentales y que permita obtener resultados válidos.

Diseño experimental: experimentalmente se condiciona la reproducibilidad o replicabilidad. Debiendo ser, bien conocidas y manejables las propiedades físicas y químicas de los compuestos químicos que se emplean, siendo puntos críticos la preparación y almacenamiento de los compuestos y solventes, además de los asociados con la producción de los organismos de prueba. De la misma manera, son básicas las réplicas al llevar a cabo la evaluación estadística de medidas.

Se debe tener en cuenta en pruebas de toxicidad ciertos factores como fuente potencial de confusión. De los cuales se pueden mencionar: número de repeticiones, número de tratamientos/grupos de dosis o concentraciones. La aleatorización es el principio básico en el diseño estadístico, por lo cual, las intenciones de cumplir con este principio ofrecen resultados más confiables y reproducibles, pues la muestra aleatoria es un requisito imprescindible al validar toda prueba estadística. Empleándose dos diseños básicos generalmente:

1. Establecimiento de una relación dosis-respuesta.

2. Análisis de varianza (ANOVA)

Pretendiéndose obtener estimaciones de los parámetros del modelo elegido, con el que relaciona variables, utilizando el modelo con estimaciones de los parámetros encontrados útiles para determinar valores de la concentración del toxico causante de un efecto determinado sobre los organismos expuestos, como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación dosis-respuesta,

5.12.3.1. Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad:

Para estimar la CL_{50} de pruebas de toxicidad aguda la selección del método, dependerá de la distribución de tolerancias, y la caracterización de las concentraciones seleccionadas (el número de mortalidades parciales).

A continuación algunos métodos para la estimación de la $CL_{50}/CE_{50}/DL_{50}$ los cuales son:

- **Método de Litchfield-Wilcoxon** (gráfico): Este método consiste en la construcción de una gráfica a partir de los datos obtenidos en pruebas de toxicidad aguda de un agente tóxico. Se utiliza papel *prob-log*, en el cual se colocan en el eje de las X el logaritmo (X) de las concentraciones usadas y en el eje de las Y el porcentaje de respuesta del efecto observado. Para el cálculo de la $CL_{50}/CE_{50}/CL_{50}$ mediante este método, es necesario tener por lo menos, un porcentaje intermedio de efecto observado (valores entre 0 y 100% de efecto).
- **Método de Spearman -Kärber (no paramétrico)**: Es un método aproximado, no paramétrico, que proporciona una buena estimación de la media y la desviación estándar. Si la distribución es simétrica, se obtiene una estimación de la concentración total mediana (CL_{50}). (López, 2009)

Los Método gráfico, Probit, de Reed Muench y ANOVA se describen más ampliamente en los siguientes numerales:

5.12.3.1.1. Método gráfico:

(Bernal & Rojas, 2007) Explica que: En este método, se parte de los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda, y utilizando papel logarítmico se grafican en el eje de las X las concentraciones (mg/L) y en el eje de las Y el porcentaje de mortalidad. Se colocan los puntos de los porcentajes de mortalidad observados (en escala lineal) en función de las concentraciones probadas (en escala logarítmica); se conectan los puntos obtenidos más cercanos al 50% del efecto observado, o sea, a la mayor concentración que no causa efecto tóxico y a la menor concentración que causa efecto tóxico. A partir de la recta trazada, se obtiene el punto de corte correspondiente al 50% del efecto observado. Este valor corresponde a la CL_{50} del estímulo o agente estudiado. Cuando no se logra hacer un ajuste adecuado de los datos, se pueden utilizar otros métodos para hacer las estimaciones de CL_{50} .

5.12.3.1.2. Método Próbit

Consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; nos da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición.

Este método constituye una alternativa log-lineal que maneja conjuntos de datos con variable dependiente categórica. Este modelo es empleado para analizar datos del tipo dosis respuesta. Ya que los datos obtenidos de un bioensayo son diferentes a los ensayos de campo y no se analizan con la metodología estadística tradicional sino que se utiliza la estadística cuantil, caracterizada por la respuesta a un estímulo de n unidades experimentales, donde r unidades responden y $n - r$ no lo hacen.

El modelo matemático en un experimento típico de pruebas de toxicidad tiene la siguiente situación:

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de individuos (n).
- Número de organismos muertos o afectados (r).
- Porcentaje de efecto (p).

$$p = \left(\frac{r}{n}\right) * 100$$

El objetivo del análisis es evaluar el nivel de estímulo necesario en la obtención de una respuesta en un grupo de individuos de la población.

El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como DL_{50} por dosis letal media (o DE_{50} por dosis efectiva media, CL_{50} por concentración letal media, CE_{50} por concentración efectiva media y Ltm por límite de tolerancia media). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL_{50} , esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo. (GUIAR, 1999)

La representación gráfica de p vs. d , o relación dosis-respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Una forma de abordar este problema es transformando d a una escala logarítmica ($X = \log_{10}(d)$); de esta manera la distribución de p vs. X será de tipo normal.

Después mediante las tablas de Probit se transforma p (porcentaje de efecto) a unidades Probit (buscando en una tabla de distribución normal el valor de z correspondiente a una probabilidad acumulada igual a p y sumándole a continuación cinco unidades), obteniéndose una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico. Enfatizando que el Probit es una transformación sobre la tasa de efecto (p), y la ecuación generada es de la forma:

$$y = ax + b$$

Donde:

- y (expresado en unidades Probit) = $z + 5$
- a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión.

Así, cuando $p = 50\%$ entonces

$y = 5$, por lo tanto:

$$X_5 = \log_{10} CL_{50}, \text{ entonces } CL_{50} = 10^5$$

Para facilitar los cálculos, simplemente se puede usar un software como el suministrado por la US Environmental Protection Agency (US EPA): Probit Analysis Program, El procedimiento Probit permite encontrar estimadores m-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efecto vs. dosis dentro del marco de la regresión.

5.12.3.1.3. Método de Reed y Muench

El Método de Reed y Muench es el procedimiento empleado para calcular puntos finales de 50%, como parte de pruebas de neutralización cuantitativa. La distancia en la cual se encuentran el punto final de 50% se obtiene mediante el % mortalidad mayor de 50%-50% sobre % de mortalidad mayor de 50% menos % de mortalidad menor de 50%. Entonces el logaritmo negativo DL_{50} será igual al Log negativo de la dilución mayor al 50% de mortalidad más la distancia proporcional, (Cyclopedia.net, 2004).

Según (Davis, Dulbecco, Einten, Ginsberg, 1990), Se basa en la suposición de que el número de unidades de prueba afectadas varía proporcionalmente al \log_{10} de la dilución, es decir que a diluciones menores el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores. Además, se supone que en la zona cercana al 50% de Efecto éste varía linealmente con la dosis. Es muy importante no omitir ninguna dilución intermedia.

Su valor estadístico está dado por el aumento del número de repeticiones que se obtiene por el cómputo de los valores acumulativos de las respuestas positivas o negativas, (SENACSA, 2001).

Los resultados se deben expresar de acuerdo al método utilizado y solo podrán ser reproducibles siempre que se emplee el mismo método y el mismo sistema, el que deberá ser referido en el resultado.

5.12.3.1.4. *Análisis de varianza (ANOVA): (López, 2009)*

En estadística el análisis de varianza (ANOVA) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. Esta prueba está diseñada para comparar los resultados obtenidos para un tratamiento en particular contra un control (tratamiento con dosis cero). Para este tipo de análisis se requiere que el número de réplicas por tratamiento sea superior a tres y que todos los tratamientos tengan el mismo número de réplicas. En el caso que las réplicas sean menor de tres no se deberá proceder con una prueba hipótesis.

El análisis de varianza parte de algunos supuestos que han de cumplirse:

- La variable dependiente debe medirse al menos a nivel de intervalo.
- Independencia de las observaciones.
- La distribución de la variable dependiente debe ser normal.
- Homogeneidad de las varianzas

Los modelos de *efectos aleatorios* asumen que en un factor se ha considerado tan sólo una muestra de los posibles valores que éste puede tomar, estos modelos se usan para describir situaciones en que ocurren diferencias incomparables en el material o grupo experimental. El ejemplo más simple es el de estimar la media desconocida de una población compuesta de individuos diferentes y en el que esas diferencias se mezclan con los errores del instrumento de medición. La técnica fundamental consiste en la separación de la suma de cuadrados (SS, 'sum of squares') en componentes relativos a los factores contemplados en el modelo. Como ejemplo, se muestra el modelo para un ANOVA simplificado con un tipo de factores en diferentes niveles.

$$SSTotal = SSError + SSFactores$$

El número de grados de libertad (gl) puede separarse de forma similar y se corresponde con la forma en que la distribución chi-cuadrado describe la suma de cuadrados asociada.

$$glTotal = glError + glFactores$$

6. BENEFICIARIOS

Este trabajo comunitario está dirigido tanto para los estudiantes y docentes de la Universidad Técnica de Manabí y se puede incluir a la población de la ciudad de Portoviejo los beneficiarios son:

6.1. BENEFICIARIOS DIRECTOS

Los ensayos ecotoxicológicos son técnicas de determinación de toxicidad mediante la interpretación dosis- respuesta, en un modelo biológico, considerándose como un instrumento vital **para los Docentes y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Química de la Universidad Técnica de Manabí** permitiéndoles obtener nuevos conocimientos mediante dichas prácticas fortaleciendo las habilidades de investigación, buscando nuevos índices de toxicidad de varios compuestos. Y también apoyando el refuerzo de la teoría obtenida en las aulas de clases con las prácticas de laboratorios en un área que cuente con el equipo necesario para el desarrollo de las prácticas.

A la vez otorga beneficio a los **Estudiantes que realizaron el proyecto de investigación**, debido a la profunda investigación que conllevó la ejecución de esta tesis, se obtuvo nuevos conocimientos abriendo un preámbulo en el área de ecotoxicología, creando el auge como innovadores en este tema, considerando que se tiene poca cantidad de información desarrollada en el país.

Para la **Universidad** ya que este hecho permitirá incursionar en el mejoramiento e innovación del proceso de investigación científica sobre un tema que cada día toma mayor fuerza debido a la importancia ecológica que se le brinda a cada proceso y la necesidad de conocer cómo afecta al organismo un toxico considerado como peligroso.

6.2. BENEFICIARIOS INDIRECTOS

Esta tecnología implementada beneficia de tal modo a los **Estudiantes de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas**, procesos académicos demostrando que se puede realizar una investigación científica con pequeñas aportaciones tecnológicas en un laboratorio, lo cual mejoraría la calidad de enseñanza y categorización de la facultad.

Las autoridades competentes al tema de control ambiental debido a los resultados obtenidos del problema de la bioacumulación y biomagnificación de los metales pesados considerados tóxicos conocerán los efectos producidos y se podrían plantear las medidas que pueden dar solución al problema planteado en nuevos estudios muchos más profundos.

La población de la ciudad de Portoviejo ya que con este tipo de ensayos se puede conocer de forma más extensa los efectos que causa un toxico en el ambiente, llevando en nuevas investigaciones usando variables con nuevos patrones este ensayo propuesto hacia las normas de calidad ambiental en los recursos tales como agua, suelo y aire.

7. METODOLOGÍA

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 los hechos y control sobre el objeto de estudio.

7.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se desarrolló un trabajo de tipo descriptivo y correlacional con diseño experimental mediante ensayos.

Los estudios ecotoxicológicos complementan los resultados de los parámetros físicos-químicos, y biológicos. En la presente investigación se realizaron ensayos ecotoxicológicos *ex situ* de toxicidad aguda y el parámetro empleado es la concentración letal media (CL₅₀) la cual señala la concentración (en este caso dilución de la muestra) que ocasiona la mortalidad del 50% de la población expuesta al contaminante.

7.2. MÉTODOS

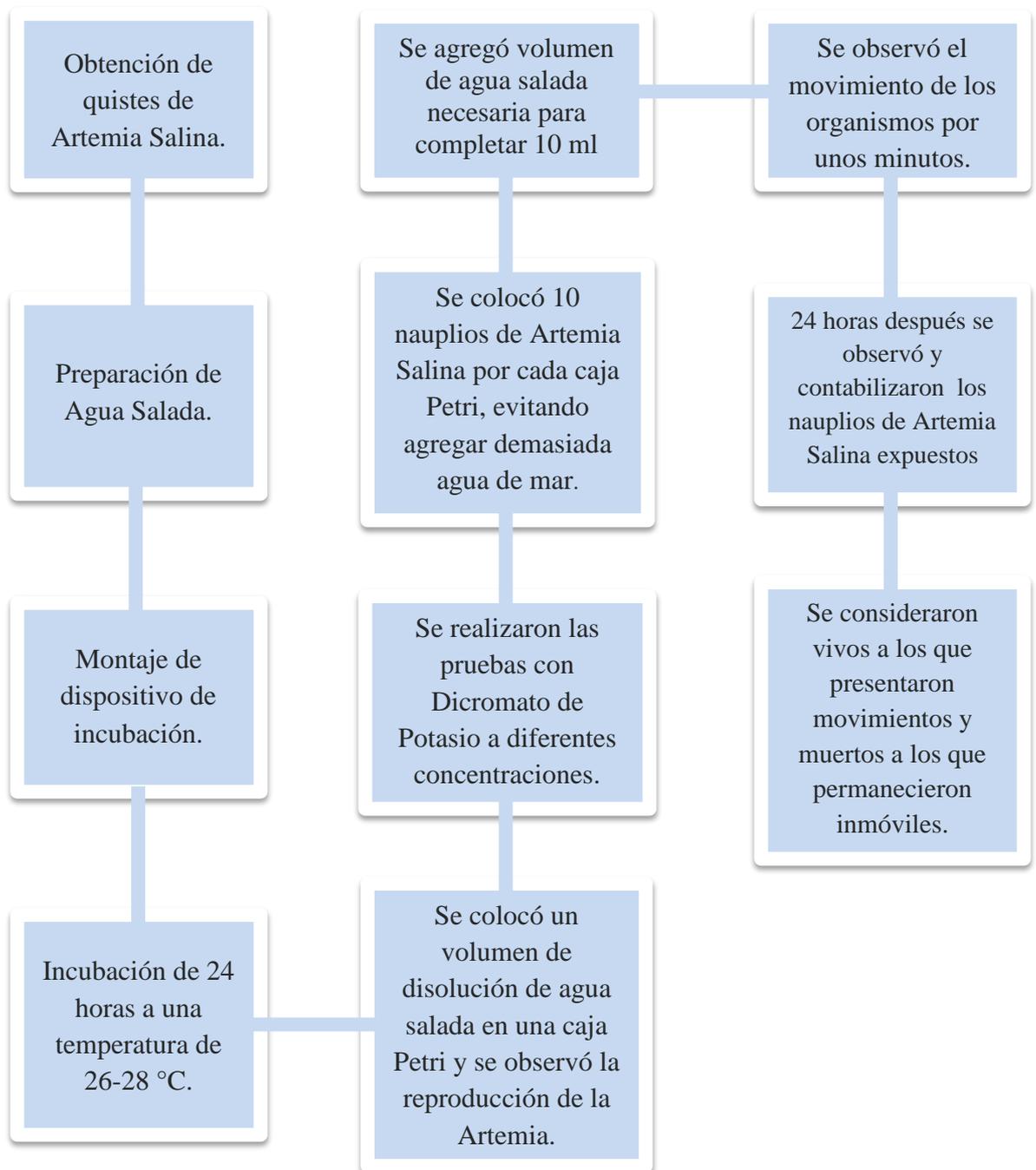
Dentro de los diferentes métodos que se utilizaron para la ejecución de la investigación se encuentran:

- 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 ecotoxicológico en biomodelos experimentales (*Artemia Salina*) de acuerdo a los puntos críticos determinados para el contaminante.
- Métodos estadísticos: Para tabular, presentar e interpretar los datos surgidos de la investigación, se emplearon, los métodos de recolección, descripción,

visualización y resumen de datos originados a partir de los fenómenos de estudio. Los datos después de ser 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 de 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 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 Statagraphic.

7.3. DISEÑO EXPERIMENTAL – METODOLOGÍA

DIAGRAMA N° 1



Elaborado por: Autores de la Tesis

7.4. ENSAYO

7.4.1. PROCEDIMIENTO DE ESTERILIZACIÓN

Para los ensayos se adquirió en una tienda los huevecillos o quistes de *Artemia Salina* contenidos en un recipiente cerrado al vacío, por lo cual, se dedujo que poseía un nivel de asepsia ideal, una vez abierto el recipiente, como regla primordial se los debe mantener en un lugar fresco y aislado de algún posible contaminante y de la luz, cuya razón es la sensibilidad que posee la *Artemia* a estos factores y al empleo que se les va a dar.

En nuestro caso el excedente una vez abierta la lata de origen, se lo guardó en recipientes de vidrios ámbar debidamente cerrados, para que no reciban luz, en un lugar seco y fresco. Cabe recalcar que para la incubación y eclosión de los quistes de *Artemia* es necesario que todos los aparatos y materiales a utilizar deben estar previamente esterilizados para evitar presencia de agentes contaminante, este proceso se lo llevo a cabo con la ayuda de la luz ultravioleta de la cámara de flujo durante aproximadamente 15 min. Las cajas Petri no fueron necesarias esterilizarlas debido a que se emplearon cajas nuevas que se adquirieron para la implementación del laboratorio.

7.4.2. PREPARACIÓN DE AGUA DE DILUCIÓN Y MEDIO DE ECLOSIÓN DE LOS QUISTES

7.4.2.1. Preparación de agua salada medio de eclosión de los quistes de *Artemia Salina*

Como ya se mencionó en la literatura referencial las *Artemias* salinas crecen y necesitan para su desarrollo un medio salino, por lo tanto se procedió a la preparación de la solución de 1 litro de agua de mar (artificial) con una salinidad común del agua marina (26g/L). Empleando NaCl (sal común) y agua destilada. La solución de agua salada fue utilizada para medio de eclosión de los quistes y como medio de dilución para las variadas series de disoluciones de las sustancias experimentales.

Para el caso de la primera incubación se empleó la sal comercial, tomando aproximadamente 15.25 gr y se diluyó con 100 ml de agua destilada, posteriormente se llevó a un balón volumétrico de 1 litro con aproximadamente 500ml de agua destilada, obteniéndose en total 600ml de agua salada la cual se empleó como medio de eclosión de los quistes de Artemia salina.

$$\% \text{concentracion masica} = \frac{\text{gr soluto}}{\text{l solucion}}$$

$$\% \text{concentracion masica} = \frac{15.25g}{0.600l} = 25.42 \text{ gr/l}$$

Para el agua empleada en la dilución para las diversas concentraciones de la sustancia experimental y segunda reproducción de las Artemias, se preparó de la misma manera un litro de agua salada, en este caso empleando sal en grano sin procesar, la cual previa trituración y esterilización con luz ultra violeta, se pesó 25.015 gr los cuales se diluyeron con 100 ml de agua destilada pasándolos a un matraz aforado de 1000 ml llevándolo hasta su capacidad de aforo.

$$\% \text{concentracion masica} = \frac{25.015g}{1l} = 25.015 \text{ gr/l}$$

Se debe recalcar que se tomaron parámetros físicos para compararlos con los indicados como óptimos para el crecimiento de Artemias, como el pH y temperatura de cada una de las diluciones los cuales se acercaban a los necesitados y se detallan en la siguiente tabla:

TABLA N° 13

Parámetros físicos de las disoluciones de agua salada.

DISOLUCION	TEMPERATURA	pH
Disolución con sal comercial	28 °C	7.2
Disolución con sal en grano	28 °C	6.7

Fuente: datos obtenidos en el laboratorio

Elaborado por: Autores de la tesis

7.4.2.2. Montaje de dispositivo de incubación

En cámara de flujo se encontraban todos los aparatos y materiales ya esterilizados previamente. El eclosionador fue adquirido en una tienda de mascotas, ya que era necesario un contenedor oscuro con algunos orificios; uno para la dosificación del aire y otro para la entrada de la luz.

Se procedió entonces a colocar una manguera desde la bomba de aireación hacia la caja eclosionadora, revisando la dosificación continua de aire para comprobar que todo funcione perfectamente, luego se observaron las condiciones de luz y temperatura que no se presenten alteración alguna. Una vez hecho este proceso se da paso a la eclosión de los quistes.

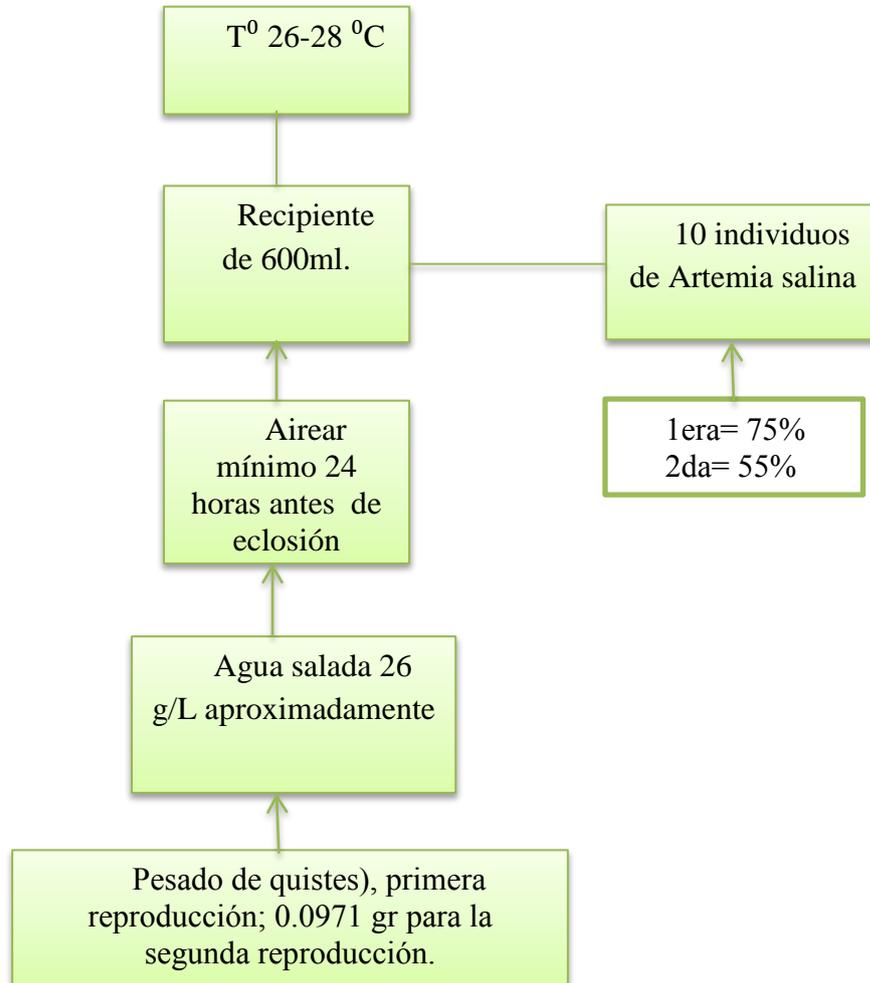
7.4.2.3. Eclosión de los Quistes

La eclosión de los quistes se inició 24 horas antes de iniciar las pruebas de toxicidad en *A. salina*. Se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación del medio y montaje del equipo
- Aireado del medio de dilución que se utilizó para la eclosión con bomba de aire empleada en acuarios.
- Llenado del eclosionador hasta el nivel marcado 600 ml con la solución salada antes preparada.
- Vertido del contenido pesando en la balanza de quistes de *Artemia salina*, 0,2852gr (cantidad de medidor incluido en lata de quistes), primera reproducción; 0.0971 gr de quistes para la segunda reproducción.
- Se tapa el eclosionador para mantener la oscuridad necesaria dejando que por el único orificio entre la dosificación de luz fluorescente de la cámara por las 24 horas necesarias.
- Dejarlo por 24 horas a una temperatura de aproximadamente entre 26 y 28 °C y aireación continua.

DIAGRAMA N° 2

Proceso de eclosión de los quistes de Artemia Salina



Elaborado por: Autores de la tesis.

Se debe tener en cuenta que los huevos no eclosionados usualmente se sientan al fondo y las capsulas vacías flotan en la superficie del agua. Las Artemias vivas son atraídas por la luz la cual permite juntarlas en un lugar usando un punto de luz para recogerlas después para el ensayo.

7.4.2.4. Observación del porcentaje de reproducción de la Artemia salina después de su eclosión.

Después de las 24 horas de que los quistes de Artemia Salina han eclosionado, se procede a tomar un determinado volumen (7ml en nuestro caso) con una pipeta serológica de agua salada donde se encuentran las Artemias contenida en un matraz, traspasadas anteriormente del equipo de incubación, llevándolo a una caja Petri para

observar la cantidad de nauplios de Artemias vivas y determinar un porcentaje promedio de reproducción, el cual indicara si las condiciones de incubación y reproducción fueron optimas, en el caso de que el porcentaje resultara mínimo se deben revisar tanto las condiciones de temperatura, pH, aireación y luz, como el agua salada preparada, para realizar una nueva eclosión de los quistes hasta que se considere favorable el índice reproducción de la Artemia salina para realizar los ensayos de toxicidad posteriormente.

De la primera solución empleada de agua salada con la concentración de 25.41 gr/l empleando sal comercial (sal yodada) para la primera reproducción empleando 0.28 gr de quistes de Artemia en 600 ml de agua salada después de las 24 horas se tomó una muestra de 7 ml correspondiente al 1.16% del total de la muestra, se encontraron los siguientes datos que se ven en la tabla:

TABLA N° 14

Valores promedio de la primera reproducción de nauplios vivos de Artemia salina observados

Observaciones	Nauplios de Artemias vivas
1	92
2	83
3	88
Promedio	87,67

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

$$\% \text{ de Artemias vivas} = \frac{87.67}{1.16} = 75.57\%$$

Correspondiente al 75.57 % de Artemias vivas, superando al 50% de su totalidad por lo cual se la considera aceptable el medio de reproducción considerando que se empleó sal yodada.

En la segunda reproducción se empleó sal en grano con una concentración de 25.015gr/l se llevaron a eclosionar 0.0971 gr de quistes de Artemia en la misma cantidad de agua salada 600 ml (medida tope del eclosionador), después de las 24 horas se tomó una muestra de 10 ml desde el equipo de incubación directamente, con

una pipeta esterilizada hacia una caja Petri , correspondiente al 1.67% de la muestra total y se procedió a la observación y conteo de los nauplios de Artemias como se detalla en la siguiente tabla:

TABLA N° 15

Valores promedio de la segunda reproducción de nauplios vivos de Artemia salina observados

Observaciones	Nauplios de Artemias vivas
1	89
2	90
3	92
Promedio	90,33

Fuente: Datos recolectados en la investigación
Elaborado por: Autores de la tesis.

Por lo tanto de acuerdo a la siguiente ecuación se determina que la tasa de reproducción es la siguiente:

$$\% \text{ de Artemias vivas} = \frac{90.33}{1.67} = 54.57\%$$

Por lo tanto su tasa de reproducción es de 54.57% mucho menor a la anterior pero también se considera que se tomaron menos gramos de quistes de Artemia salina para un mismo volumen, por lo cual no es muy significativa la diferencia, tomando al medio de reproducción como óptimo, para su desarrollo.

De tal manera se eligió emplear las Artemias de la primera reproducción para los ensayos posteriores y como sustancia para complemento para las diferentes disoluciones el agua salada de la segunda reproducción.

7.4.3. PREPARACIÓN DE LA SERIE DE DILUCIÓN DE LA SUSTANCIA (TÓXICO), LLENADO DE PLACAS

Las soluciones para las pruebas de toxicidad fueron preparadas con agua salada, a excepción de la solución madre del toxico de referencia la cual fue preparada con agua destilada cuyo valores de TDS mostraron su nivel de pureza (0.00 ppm).

Los ensayos se realizaron con cuatro concentraciones distintas expresadas en partes por millón (ppm) de la sustancia toxica y otra de control por triplicado obteniendo el test definitivo, teniendo en cuenta que en la literatura se indican como mínimo dos replicas, 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 viera alterada, para evitar la mortandad de los organismos a prueba debido al cambio de temperatura de la misma.

7.4.3.1. 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 determina mediante cálculos los gramos necesario para tener una concentración de 100 ppm la cual es la siguiente

$$1 \text{ ppm} = \frac{mg}{l} = \frac{1mg}{1l} = \frac{1mg}{1000ml} \therefore 100ppm = \frac{100mg}{1000ml}$$

Pero solo se requiere la preparación de 50 ml debido a que no se necesitara grandes cantidades para el ensayo.

$$X \text{ mg} = \frac{100mg * 50ml}{1000ml} = 5mg \text{ de } K_2Cr_2O_7$$

- Por lo tanto una vez calculado los gramos necesarios para tal concentración, se pesaran aproximadamente 5 mg de $K_2Cr_2O_7$ para obtener una concentración de 100 ppm. En nuestro caso se pesó 5.25 mg de $K_2Cr_2O_7$, con ayuda de la balanza analítica digital del laboratorio.

- Después de pesar se diluyó en un vaso de precipitación en 10 ml de agua destilada traspasando su contenido a un matraz aforado hasta los 50 ml con agua destilada.
- Se dejó reposar un momento para luego proceder a hacer las diferentes diluciones con variadas concentraciones.

A continuación se hace énfasis a lo expuesto en un esquema:

ESQUEMA N° 1

Preparación de Solución Madre de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)



Elaborado por: Autores de la tesis.

7.4.3.2. Preparación de soluciones a partir de la solución madre de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Con la solución Madre de 100 ppm se procedió a calcular las diferentes concentraciones volumétricamente, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Dónde:

V_2 = Volumen a preparar (capacidad del balón 50 ml).

C_2 = Concentración a trabajar.

V_1 = Volumen a Calcular.

C_1 = Concentración Solución Patrón

Despejando la ecuación anterior para determinar el volumen necesario para obtener la concentración deseada nos queda:

$$V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1}$$

7.4.3.2.1. Solución de 5ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

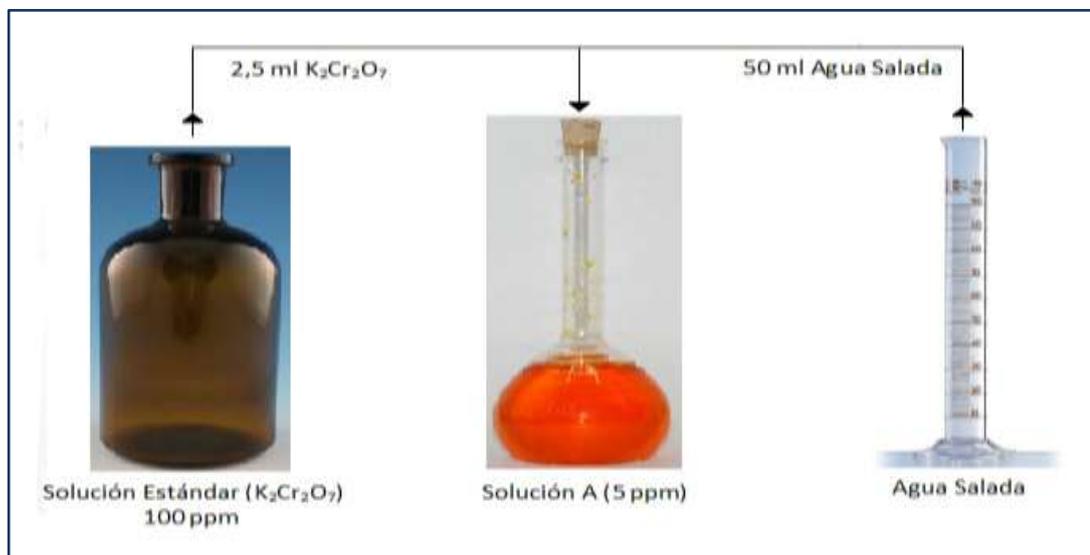
- Se calcula con la formula anterior el volumen requerido de la solución madre el cual es:

$$V_1 = \frac{50ml * 5ppm}{100ppm} = 2.5 ml$$

- Una vez determinado el volumen con ayuda de una pipeta serológica, previamente esterilizada y una pera de succión se extraen los 2.5 ml de la solución madre de dicromato ya preparada.
- El volumen anterior se lo diluye completando los 50 ml con agua salada con las condiciones mencionadas anteriormente, para mantener una concentración de 5ppm. Ver el siguiente esquema:

ESQUEMA N° 2

Solución de 5 ppm a partir de la Solución Madre de Dicromato de Potasio



Elaborado por: Autores de la tesis.

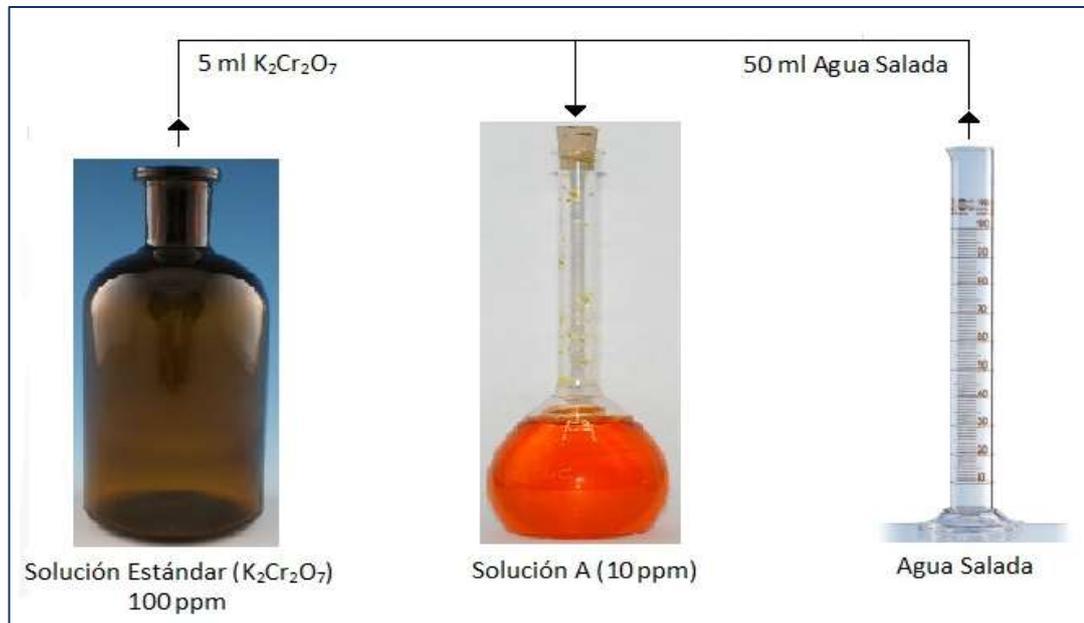
7.4.3.2.2. Solución de 10 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)

- Se calcula con la fórmula anterior el volumen requerido de la solución madre el cual es:

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml} * 10 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 5 \text{ ml}$$

- Una vez calculado el volumen, con ayuda de una pipeta serológica, previamente esterilizada y una pera de succión se extraen los 5 ml de la solución madre de dicromato preparada anteriormente.
- Se lleva a aforar con agua salada preparada con las condiciones mencionadas anteriormente hasta los 50 ml, para mantener una concentración de 10 ppm. Ver el siguiente esquema:

ESQUEMA N° 3
Solución de 10 ppm a partir de la Solución Madre de Dicromato de Potasio



Elaborado por: Autores de la tesis.

7.4.3.2.3. Solución de 15 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇)

- Se calcula con la fórmula anterior el volumen requerido de la solución madre el cual es:

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml} * 15 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 7.5 \text{ ml}$$

- Ya calculado el volumen necesario de forma analítica, con ayuda de una pipeta serológica, previamente esterilizada y una pera de succión se extraen los 7.5 ml de la solución madre de dicromato preparada anteriormente.
- Se llena con agua salada preparada con las condiciones mencionadas anteriormente hasta los 50 ml, para mantener una concentración de 15 ppm. Ver el siguiente esquema:

ESQUEMA N° 4
Solución de 15 ppm a partir de la Solución Madre de Dicromato de Potasio



Elaborado por: Autores de la tesis.

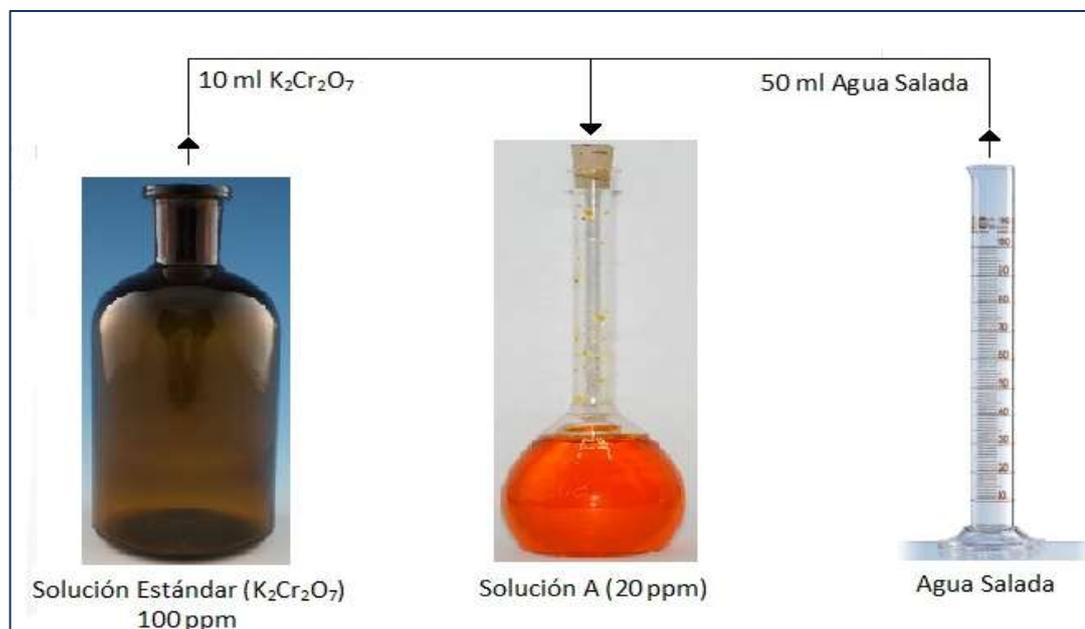
7.4.3.2.4. Solución de 20 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

- Se calcula con la formula anterior el volumen requerido de la solución madre el cual es:

$$V_1 = \frac{50ml * 20 ppm}{100 ppm} = 10 ml$$

- Analíticamente determinado el volumen necesario para la concentración deseada, empleando una pipeta serológica, previamente esterilizada y una pera de succión se extraen los 10 ml de la solución madre de dicromato preparada anteriormente.
- Se llena con agua salada preparada con las condiciones mencionadas anteriormente hasta los 50 ml, para mantener una concentración de 20 ppm. Ver el siguiente esquema:

ESQUEMA N° 5 Solución de 20 ppm a partir de la Solución Madre de Dicromato de Potasio



Elaborado por: Autores de la tesis.

7.4.4. PRUEBAS DE TOXICIDAD

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

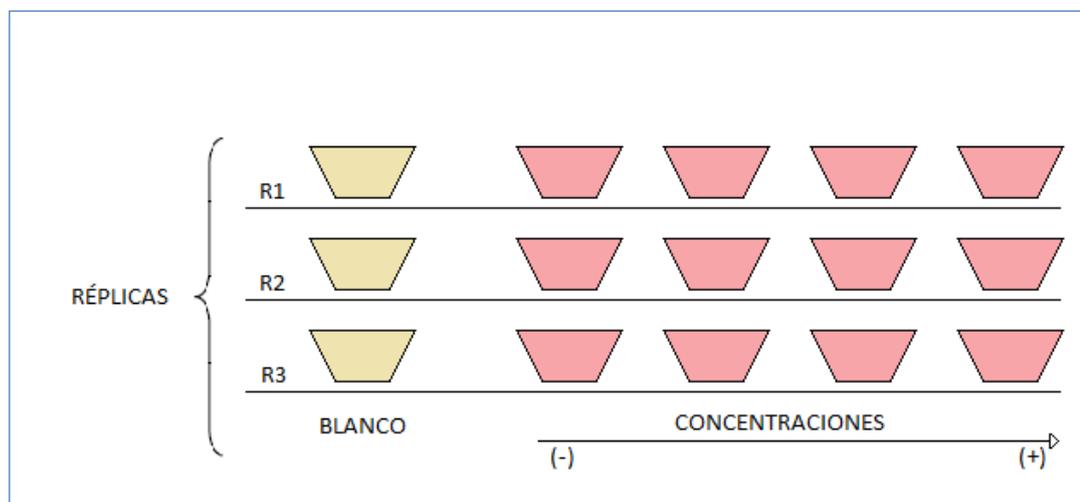
El principio de la prueba de toxicidad se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte 50% de las larvas de *Artemia* en 24 horas bajo las condiciones descritas por este procedimiento. Esta concentración es conocida como LC_{50} . Y como ya se ha mencionado anteriormente deben llevarse a cabo empleando un variado rango de concentraciones con el fin de establecer el 0 y 100% de mortalidad del tóxico sobre los organismos utilizados; que permitirán la obtención de las respectivas CL_{50} .

En las pruebas se utilizaron diez (10) organismos (*Artemia Salina* < 24 h de nacidas) por recipiente, basándose en los protocolos establecidos, placas de cuatro concentraciones más el blanco o control negativo y tres réplicas por ensayo con un

total de 15 recipientes para el ensayo toxicológico, 150 organismos por concentración, como se muestra en el esquema siguiente:

ESQUEMA N° 6

Representación del ensayo por cada concentración y cada replica



Elaborado por: Autores de la tesis.

A continuación se explica más detalladamente el proceso

1. Para el llenado de placas con diferentes soluciones como ya se puntualizó se utiliza 15 cajas Petri en total. Las 3 primeras son de “control” utilizando simplemente una solución de agua con sal 9 ml, sin reactivo, la cual también se denomina como blanco. Luego se preparan 3 cajas Petri con 9 ml de dicromato de Potasio a 5 ppm. Tres más con 9 ml de la solución a 10 ppm, 3 placas más con 9 ml de la solución a 15 ppm y finalmente 3 placas con 9 ml a 20 ppm. Se debe tener en cuenta que para cada llenado de cajas Petri se puede emplear la misma pipeta teniendo en cuenta que se va de menor a mayor concentración, por lo cual no existe posibilidad de alguna alteración. Se rotula cada una de las placas indicando la concentración, para evitar confusiones futuras que afecten el resultado final.
2. Para Transferencia de nauplios de Artemias primero se toma una muestra del eclosionador unos 20 ml aproximados en una caja Petri, luego se las expone a la luz para que se congreguen en un solo lugar y su recolección sea mucho más fácil, para ello se debe tener en cuenta que se emplean nauplios en fase I

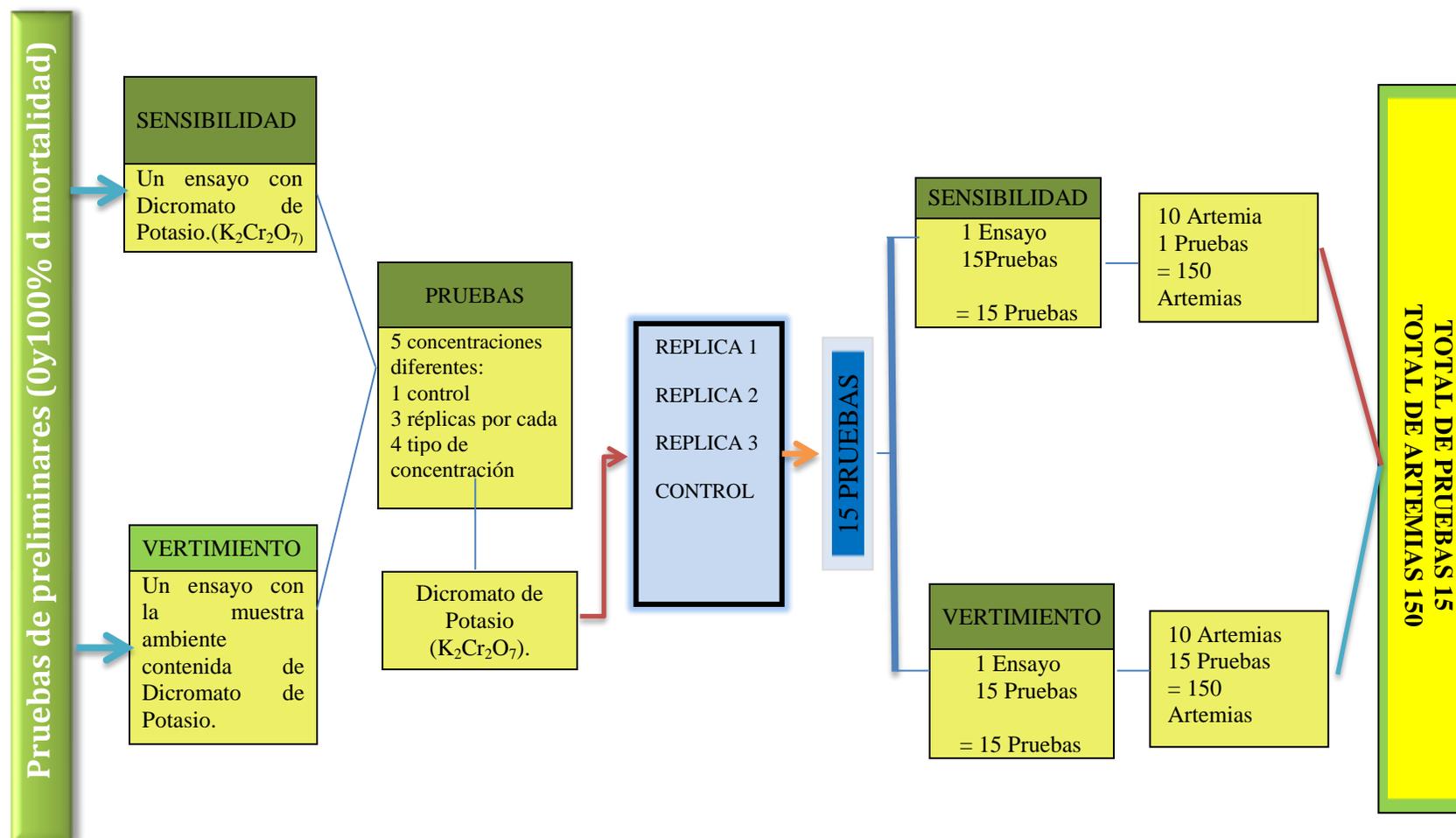
con apenas 24 horas desde su eclosión, para su recolección se utilizaron micro pipetas de 5 a 20 μ . Teniendo en cuenta de un mínimo de 10 nauplios de Artemia Salina por caja Petri.

3. Para el traspaso de las Artemias el empleo de las micro pipetas, puede ejecutarse de forma variada, en nuestro caso, no siempre se pipeteaba el mismo número de veces, había ocasiones que con una pipeteada solo salía 1 Artemia, en otras 2, en otras 3 y así sucesivamente, por lo tanto era necesario ir contando las veces que se pipeteaba hasta obtener más de 10 Artemias en las cajas Petri. Ya que cada micro pipeteada correspondía a 0.1 ml de solución salina con la que se completaba los 9 ml para obtener 10 ml en cada placa. Por ejemplo cuando habían 6 pipeteadas para un mínimo de 10 nauplios de Artemias, quería decir que iban 0,6 ml de solución, entonces al final se le completaba con 0,4 ml regulando el valor en la micro pipeta para llegar a 1 ml que era lo que nos faltaba.
4. Se observa el movimiento de los organismos por unos minutos. Una vez que todas las cajas Petri se encuentran con sus respectivas concentraciones y con la mínima cantidad de 10 Artemias se observaba el movimiento de ellas. Para comprobar que todas las Artemias se encuentren vivas.
5. Se dejan por un lapso de 24 horas en un ambiente con la mayor asepsia posible.
6. Al término de las 24 horas se realiza el conteo de los nauplios de Artemia salina que sobrevivieron en cada caja Petri, con diferentes concentraciones incluido la placa control, haciéndolo para cada replica, registrándose el número de nauplios de Artemia muertas. Las larvas son consideradas muertas si no muestran movimiento después de 10 segundos de observación y con efectos subletales aquellas que presentan movimientos leves o problemas al nadar. Observando y tomando nota también esto para realizar posteriormente los respectivos cálculos de CL_{50} .
7. Si es posible realizar la observación con ayuda del microscopio para notar la diferencia en el movimiento de una Artemia sin exposición al químico y otra expuesta al tóxico.

Se debe tener en cuenta que las concentraciones ensayadas de las muestras examinadas diluidas en agua salada deben tener las mismas características para cada replica y concentración. Los 9 ml de solución de prueba es colocada dentro de una caja Petri con diámetro de 60 mm. Las muestras son analizadas en 2 – 3 réplicas. Para evitar contaminación se debe cubrir las placas. El ensayo se realiza sin aireación ni alimentación. La temperatura de la solución debe estar en un rango de 25 - 28°C. El ensayo es por lo tanto enfocado en la mortalidad de la Artemia salina versus la concentración del toxico en el tiempo.

DIAGRAMA N° 3

Síntesis del proceso de en los ensayos ecotoxicológicos realizadas.



7.5. METODOLOGÍA DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

7.5.1. MÉTODO PROBIT

Para el cálculo de la CL₅₀ por este método es necesario contar, por lo menos, con dos porcentajes intermedios del efecto esperado (valores entre 0 y 100%).

Con los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda con *Artemia Salina* se debe construir una tabla que contenga los siguientes datos:

- Concentración de la sustancia ensayada en %
- Número de organismos muertos en cada concentración (r).
- Numero de organismos en cada concentración
- Porcentaje de mortalidad en cada concentración (P).

En una siguiente tabla se deben obtener los siguientes datos

A partir de la concentración de la sustancia ensayada se obtiene el logaritmo en base 10 de las concentraciones (x), luego con el porcentaje de mortalidad se lo lleva a la forma decimal del valor numérico, con la cual obtenemos la distribución normal estándar individual o probabilidad de cada resultado, a la cual debido a la fórmula establecida se suman 5 unidades para obtener el número Probit.

Para el grafico en el eje de las abscisas va el valor de logaritmo de la concentración en base diez, y en el ejes de las ordenadas contiene el valor del número Probit, del cual se obtiene un gráfico lineal, aplicando la regresión lineal se obtiene la ecuación de la recta en la cual conocemos los valor de intercepción y la pendiente los mismos que nos sirven para el reemplazo en la ecuación:

$$y = ax + b$$

Teniendo los valores de a y b, y dado que Probit 50 es y= 5, una vez la ecuación al despejar x queda de la siguiente manera

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

Quedando finalmente 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 software como el suministrado por la US Environmental Protection Agency (US EPA): Probit Analysis Program, en el cual solamente se ingresan los datos acumulados de Artemias expuestas y muertas a cada concentración utilizada.

7.5.2. MÉTODO DE REED MUENCH

Cabe recalcar que el Método de Reed Muench se subdivide en dos: el primero, cuando se trabaja con valores corregidos acumulados y el segundo, cuando se trabaja con valores corregidos sin acumular.

7.5.2.1. Método Reed Muench - con valores corregidos acumulados.

Para poder calcular la CL_{50} mediante éste método, es necesario primero relacionar los resultados obtenidos y mediante una gráfica poder observar si el valor de CL_{50} que se busca se acerca a la realidad, es decir al ya establecido en bioensayos anteriores (el cual es de 12,5 ppm $K_2Cr_2O_7$).

Luego de ello se aplica el modelo matemático expresado en la siguiente ecuación:

$$\log CL50 = \text{Log dosis inferior} + B \times \text{Log } A$$

Descripción del Método:

Se realiza un cuadro para calcular los porcentajes de muerte con valores acumulados corregidos. ¿Cómo se lo hace?; Primero, en una tabla se anotan las Artemias muertas, con efecto subletales y vivas para cada concentración empleada sin excluir el grupo control; considerando al final un total de Artemias empleadas para cada concentración.

Luego se procede a realizar otra tabla, en la que debe constar el total de Artemias y así mismo el total de muertas y de vivas (incluyendo aquí las que tuvieron un efecto subletal). A continuación se calculan las Artemias muertas acumuladas y las

Artemias vivas acumuladas. Para el caso de las muertas se las va sumando normalmente es decir de principio a fin; mientras que para las vivas acumuladas se hace un conteo desde el final al principio. Una vez calculadas se hace una suma total, la cual se considera total acumuladas (muertas y vivas acumuladas). Entonces se procede a calcular el porcentaje de muertas acumuladas, para ello se utiliza la relación entre muertas acumuladas y total acumuladas multiplicándose por 100. Ya una vez obtenido el porcentaje de muertas acumuladas se le hace la respectiva corrección, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ muertas acum correg} = \frac{\% \text{ muertas acum} - \% \text{ muertas acum menor}}{100 - \% \text{ muertas acum menor}}$$

Así, se va a obtener el porcentaje de muertas acumuladas corregido. Se procede a realizar la gráfica, para ello se utiliza los valores de concentraciones (0, 5, 10, 15, 20) y también los valores obtenidos de porcentajes de muertas acumuladas corregido, respectivamente.

Se grafica la curva para conocer si se está aproximando la CL₅₀ al valor real.

Luego de ello se procede al cálculo matemático para encontrar la CL₅₀, para ello se utiliza la fórmula ya detallada anteriormente:

$$\log CL_{50} = \log \text{ dosis inferior} + B \times \log A$$

Si bien, se observa el valor de dos constantes que son A y B, los cuales se los puede calcular mediante fórmulas, para el caso de A, se tiene:

$$A = \text{dosis superior} / \text{dosis inferior}$$

En ésta investigación, se sabe que el valor de dosis superior es de 20, mientras que el valor de dosis inferior es 5; por lo tanto la constante A será de 4.

Para encontrar B, se expresa la fórmula:

$$B = (50 - \% \text{ inferior}) / (\% \text{ superior} - \% \text{ inferior})$$

En cuanto a la ecuación, el % inferior se refiere al menor valor de porcentaje de muertas acumuladas corregido, mientras que el % superior se refiere al mayor valor de porcentaje de muertas acumuladas corregido.

Entonces una vez obtenidas las constantes, se puede proceder a calcular la CL_{50} .

7.5.2.2. Método Reed Muench - Con valores corregidos sin acumular.

Al igual que el método anterior, que utiliza valores acumulados corregidos, en éste también es necesario primero relacionar los resultados obtenidos y mediante una gráfica poder observar si el valor de CL_{50} que se busca se acerca a la realidad, es decir al ya establecido en bioensayos anteriores (el cual es de 12,5 ppm $K_2Cr_2O_7$).

Luego de ello se aplica el modelo matemático expresado en la siguiente ecuación:

$$\log CL_{50} = \text{Log dosis inferior} + B \times \text{Log } A$$

Descripción del Método:

Se realiza un cuadro para calcular los porcentajes de muerte con valores acumulados corregidos. ¿Cómo se lo hace?; Primero, en una tabla se anotan las Artemias muertas, con efecto subletales y vivas para cada concentración empleada sin excluir el grupo control; considerando al final un total de Artemias empleadas para cada concentración.

Luego se procede a realizar otra tabla, en la que debe constar el total de Artemias y así mismo el total de muertas y de vivas (incluyendo aquí las que tuvieron un efecto subletal). A continuación se calcula el porcentaje de Artemias muertas, se lo hace simplemente relacionando las Artemias muertas en cada concentración y el total de Artemias expuestas en cada concentración, multiplicándolo por 100. A ese porcentaje de muertas, se le hace la debida corrección, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ muertas correg} = \frac{\% \text{ muertas} - \% \text{ muertas menor}}{100 - \% \text{ muertas menor}}$$

Luego que se obtenga el porcentaje de muertas corregido, se procede a realizar la gráfica; para ello se utiliza los valores de concentraciones (0, 5, 10, 15, 20) y también los valores obtenidos de porcentajes de muertas corregido.

Se grafica la curva para conocer si se está aproximando la CL_{50} al valor real.

Luego de ello se procede al cálculo matemático para encontrar la CL_{50} , para ello se utiliza la fórmula ya detallada anteriormente:

$$\log CL_{50} = \text{Log dosis inferior} + B \times \text{Log A}$$

Si bien, se observa el valor de dos constantes que son A y B, los cuales se los puede calcular mediante fórmulas, para el caso de A, se tiene:

$$A = \text{dosis superior} / \text{dosis inferior}$$

En ésta investigación, se sabe que el valor de dosis superior es de 20, mientras que el valor de dosis inferior es 5; por lo tanto la constante A será de 4.

Para encontrar B, se expresa la fórmula:

$$B = (50 - \%inferior) / (\%superior - \%inferior)$$

En cuanto a esta ecuación, el % inferior se refiere al menor valor de porcentaje de muertas corregido, mientras que el % superior se refiere al mayor valor de porcentaje de muertas corregido.

Entonces una vez obtenidas las constantes, se puede proceder a calcular la CL_{50} .

7.5.3. MÉTODO DE ESTIMACIÓN GRÁFICA

Para el método de estimación gráfica también se consideran los valores o resultados obtenidos durante la práctica. Para ello se realiza una tabla con los siguientes parámetros: diferentes concentraciones de Dicromato de Potasio utilizadas en el bioensayo (5, 10, 15 y 20 ppm) sin excluir el grupo control, también el número de Artemias expuestas a cada concentración, luego el número de Artemias vivas obtenidas al final del ensayo en cada concentración y por ende el valor de Artemias

mueratas; ya con esos datos se procede a calcular el porcentaje de mortalidad en cada concentración.

Para realizar el gráfico que nos va a indicar cuál será la CL_{50} que se está buscando, se utilizan los valores de las diferentes concentraciones con sus respectivos porcentajes de mortalidad.

En el gráfico el valor de CL_{50} va a corresponder al que corte la curva graficada, justamente cuando el eje de las y o sea el porcentaje de mortalidad indique el 50%.

Éste método no es tan preciso, debido a que el resultado obtenido depende del valor que estime el investigador, ya que solo se lo puede apreciar en la gráfica, más no procede de algún modelo matemático. Sin embargo se lo utiliza para verificar que los resultados obtenidos no se alejan de la realidad.

7.5.4. 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 respuesta varía en diferentes niveles de cada factor experimental.

El programa Statgraphics con One-Way ANOVA nos 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. Por ejemplo, supongamos un factor que tiene dos niveles: 0 y 1. Para el nivel 0 se tienen las observaciones 23, 24, 19 y para el nivel 1 se tienen las observaciones 15, 21, 38, 33 y 41. Los datos se introducen en el Statgraphics en la ventana correspondiente a los datos.

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

- **Dependent 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 Options tenemos las siguientes posibilidades:

- *Analysis Summary:* proporciona información de la variable dependiente y del factor, así como del número de observaciones.
- *Summary Statistics:* hace un resumen de las propiedades estadísticas de la variable.
- *ANOVA table:* la tabla ANOVA presenta los valores de variabilidad entre y dentro de grupos. La suma de cuadrados dentro de 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 media. El F-ratio es el valor de la media de cuadrados entre grupos dividido entre el valor de la media de cuadrados dentro de grupos. El p-valor indica el nivel de significatividad (es el área a la derecha del valor F). Para valores pequeños (menores que 0.05) indica que las medias de las muestras son significativamente diferentes.

FIGURA N° 14

Ejemplo de Tabla ANOVA

ANOVA Table for capabvane by vanenums

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	128.4	19	6.75789	0.91	0.5680
Within groups	591.6	80	7.395		
Total (Corr.)	720.0	99			

Tabla ANOVA

- *Table of Means*: esta tabla muestra el número de observaciones en cada etiqueta, las medias, errores standard, y límites superior e inferior de los valores de las medias. Pulsando el botón derecho del ratón (Pane options) 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 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 options*. (stanova.dvi, 2008).

8. RECURSOS UTILIZADOS

8.1. RECURSOS HUMANOS

- Director de Tesis.
- Tribunal de Revisión.
- Docentes de la Carrera de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas.
- Asesores Internos y Externos.
- Autores de la tesis.

8.2. RECURSOS OPERATIVOS

8.2.1. MATERIALES

- Cajas de Petri de vidrio
- Embudo
- Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml
- Espátulas de acero inoxidable
- Frascos ámbar
- Matraz aforado de 50 y 1000ml
- Micro pipetas con puntas desechables
- Micro pipetas desechables
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel pH
- Pipetas serológicas de 5 y 10 ml
- Peras de succión
- Porta y cubre objetos
- Probetas graduadas de 50 y 100 ml
- Vasos de precipitación 50, 250 y 500 ml

- Viales con tapadera de rosca
- Termómetro

8.2.2. EQUIPOS

- Balanza analítica digital
- Cámara de flujo laminar
- Eclosionador de quistes de Artemia marca HOBBY
- Refrigeradora
- Microscopio óptico
- Bomba dosificadora de aire para acuarios 20HP
- Potenciómetro ATC

8.2.3. SUSTANCIA Y REACTIVOS

- Modelo biológico quistes Artemia Salina marca Ala
- Sustancia Patrón Dicromato de Potasio 99.9% de pureza
- Agua destilada
- Sal yodada
- Sal en grano
- Alcohol potable

8.2.4. VARIOS

- Bibliografías.
- Internet.
- Copias
- Impresiones.
- Consultas de asesoramiento.
- Transporte

8.3. RECURSOS FINANCIEROS

- Análisis de ensayos.
- Implementación de equipos de laboratorio.
- Internet
- Impresión de tesis
- Copias de documentos
- Materiales para ensayos
- Transporte
- Sustentación
- Varios

9. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

9.1. DESCRIPCIÓN DEL POTENCIAL IMPACTO DE DICROMATOS (Cr₂O₇)⁻² Y CROMATOS (CrO₄)⁻² AL ECOSISTEMA.

TABLA N° 16

Descripción de los efectos que causan los cromatos y dicromatos en el ecosistema.

Cromatos	Dicromatos
Son cancerígenos.	Produce sensibilización y se puede provocar alergias.
Ataca a la molécula de ADN.	Son cancerígenos.
25 ppm de Cromatos pueden presentar intoxicación por ingestión.	Ataca a la molécula de ADN.
Puede causar fuego al entrar en contacto con materiales combustibles.	Puede causar fuego al entrar en contacto con materiales combustibles.
Gran capacidad para corroer e irritar piel, ojos, membranas mucosas y tracto respiratorio.	Capacidad para corroer e irritar piel, ojos, membranas mucosas y tracto respiratorio, así como hígado y riñones.

Fuente: Datos arrojados por la investigación

Elaborado por: Autores de la Tesis

De acuerdo a la información recopilada y a lo que organizaciones de alto reconocimiento nos dicen que, "normalmente el cromo en su forma hexavalente cromatos y dicromatos se deposita en piel, pulmones, músculos y grasas pero en **cantidades superiores** o por **largo tiempo**, se acumula en órganos más frágiles como el hígado y riñones. Al ser confundidos por los canales iónicos como sulfatos por lo que pueden llegar así hasta el núcleo de la célula, y ahí la materia orgánica presente los reduce a Cromo (III), y en ese estado debido a las reacciones que se generan, ataca a la molécula de ADN.

ANÁLISIS:

Por el potencial impacto que representa para el ecosistema, la emisión de cromatos y dicromatos (cromo VI), vertidos como producto de la actividad de diferentes sectores industriales, se determinó la toxicidad aguda del K₂Cr₂O₇ en larvas de *Artemia salina* como método alternativo aplicado a la ecotoxicología. En

este versátil método se expusieron nauplios de 24 h a diferentes concentraciones del compuesto y se determina la LC_{50} correspondiente, así como los efectos adversos que pueda ocasionar. Esta metodología combina simplicidad, rapidez, confiabilidad y bajo costo, por lo que su empleo como screening en pruebas ecotoxicológicas permitió en un corto plazo predecir la toxicidad del dicromato de potasio como sustancia tóxica para los ecosistemas acuáticos.

Las mudas en *Artemia salina* son muy frecuentes y las nauplios de 24 h presentan una cutícula muy fina lo que las hace especialmente sensibles al tóxico (cromo VI), el cual penetra a través de las barreras fisiológicas absorbiéndose rápidamente y provocando diferentes alteraciones en estos organismos, que van desde efectos subletales sobre la movilidad, la reproducción y la hematología hasta la muerte de la larva.

Las descargas industriales representan un impacto ambiental negativo lo cual desencadena diversos efectos nocivos en especial a los ecosistemas acuáticos como la modificación de pH, temperatura y el oxígeno disuelto afectando de forma decisiva tanto a la distribución como al estado fisiológico de la biota del sistema acuático. Y a su vez la toxicidad del dicromato en los sistemas 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.

9.2. EXPOSICION A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DICROMATO DE POTASIO A LA ARTEMIA SALINA EMPLEADA COMO MODELO BIOLÓGICO ECOTOXICOLÓGICO

TABLA N° 17

Número de Artemias salinas expuestas a diversas concentraciones de Dicromato de potasio y los resultados finales

Concentración de K ₂ Cr ₂ O ₇	N° Artemias Salina												
	Expuestas	Vivas inicio			Vivas final			Muertas			Efectos		
Repeticiones	1	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Control	33	11	10	12	10	10	12	0	0	0	1	0	0
5ppm	43	12	16	15	9	12	12	1	0	0	2	4	3
10ppm	33	11	12	10	5	3	4	3	3	3	3	6	3
15ppm	36	13	12	11	1	1	0	8	7	9	4	4	2
20ppm	36	11	11	14	0	0	2	9	8	9	2	3	3

Elaborado por: Autores de la tesis.

Fuente: Datos de la investigación

Se expuso a la Artemia salina, el ensayo se realizó con las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 ppm de dicromato de potasio, todas fueron preparadas a partir de una solución de dicromato de potasio al 99% en agua destilada con concentración de 100 ppm, empleando también un grupo control el cual contiene solo la sustancia o medio de reproducción para nosotros agua salada, la cual no debe de presentar una considerable mortalidad puesto que si la existiese se podría suponer que la causa del deceso de las Artemias se debe a contaminación del medio en el que se reproduce.

Las concentraciones empleadas para los ensayos y a las cuales fueron expuestas las larvas de Artemia salina no fueron tomadas al azar ya que como hemos mencionado anteriormente el estudio se basa en protocolos establecidos por estudios ya realizados.

ANÁLISIS

La *Artemia* es uno de los crustáceos más tolerantes al cromo de acuerdo a estudios y revisión bibliográfica, como se puede deducir de los valores de CL₅₀ de 24 horas obtenidos en el presente trabajo, que varían entre 13,06 y 13,426 mg/L. Estos valores

pueden ser comparados con los mencionados en referencias bibliográficas en crustáceos para la CL₅₀ a las 24 y 48 h y que varían entre 0,5 y 17 mg/l de acuerdo a las concentraciones expuestas. Esta tolerancia puede ser en parte explicada 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.

La *Artemia salina* cumple con ciertas características como: buena resistencia a las condiciones de laboratorio, tener una amplia distribución geográfica, ser fácilmente identificables en el laboratorio, provenir de áreas libres de contaminación, además de tratarse de un elemento fundamental en el conjunto del zooplancton y una especie importante dentro de la cadena trófica, ofreciendo una vista general sobre los efectos que podrían ocurrir en los ambientes, por lo cual se la seleccionó como modelo biológico en este ensayo, debido a que un efecto negativo sobre su población haría peligrar la viabilidad de otras especies superiores. Sin embargo, cabe resaltar que es necesario ser muy cuidadosos con la interpretación de los resultados obtenidos de los bioensayos, 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.

9.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DEL DICROMATO DE POTASIO EN ARTEMIA SALINA Y LOS EFECTOS ADVERSOS

Los datos correspondientes a la concentración letal media del dicromato de potasio sobre nauplios de *Artemia salina* expuestos durante 24 horas, son presentados en las siguientes numerales y tablas. Empleando diversos métodos estadísticos debido que se trata de establecer un valor a una sustancia patrón. Destacándose que el pH de las diferentes soluciones preparadas, incluyendo el blanco, no tuvo una variación que pudiera incidir sobre los resultados del ensayo, se empleó pH con valor de 6.7, teniendo en cuenta que la *Artemia* puede desarrollarse perfectamente a un pH menores a 8.

9.3.1. CÁLCULO DE LA CONCENTRACION LETAL MEDIA

9.3.1.1. Evaluación estadística por el método Probit

Haciendo uso de Microsoft Excel 2013 mediante el método estadístico Probit con los datos recolectados sobre los nauplios vivos, con efectos subletales y muertos, a cada concentración durante el ensayo ecotoxicológico, se obtuvieron diferentes tablas y valores el cual el grafico necesario para determinar la concentración letal media para esta sustancia.

TABLA N°18

Datos empleados en la hoja Excel con el sistema Probit para cálculos

Concentracion K ₂ Cr ₂ O ₇ ppm	Respuesta org. Muertos	Artemias no. Expuestas	mortalidad %
0	0	11	0,0
5	1	12	8,3
10	3	11	27,3
15	8	13	61,5
20	9,00	11	81,8
100	10	10	100,0

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N° 19

Determinación mediante cálculo de la hoja Excel para el número Probit

Concentracion K ₂ Cr ₂ O ₇ ppm	log concent	% respuesta	decimal	normsinv	probit
0	#¡NUM!	0,0	0		
5	0,70	8,3	0,083	-1,382994	3,62
10	1,00	27,3	0,273	-0,604585	4,40
15	1,18	61,5	0,615	0,293381	5,29
20	1,30	81,8	0,818	0,908458	5,91
100	2,00	100,0	0,990	2,326348	7,33

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

CUADRO N° 1

Datos calculados los cuales se emplean para la gráfica y la regresión lineal

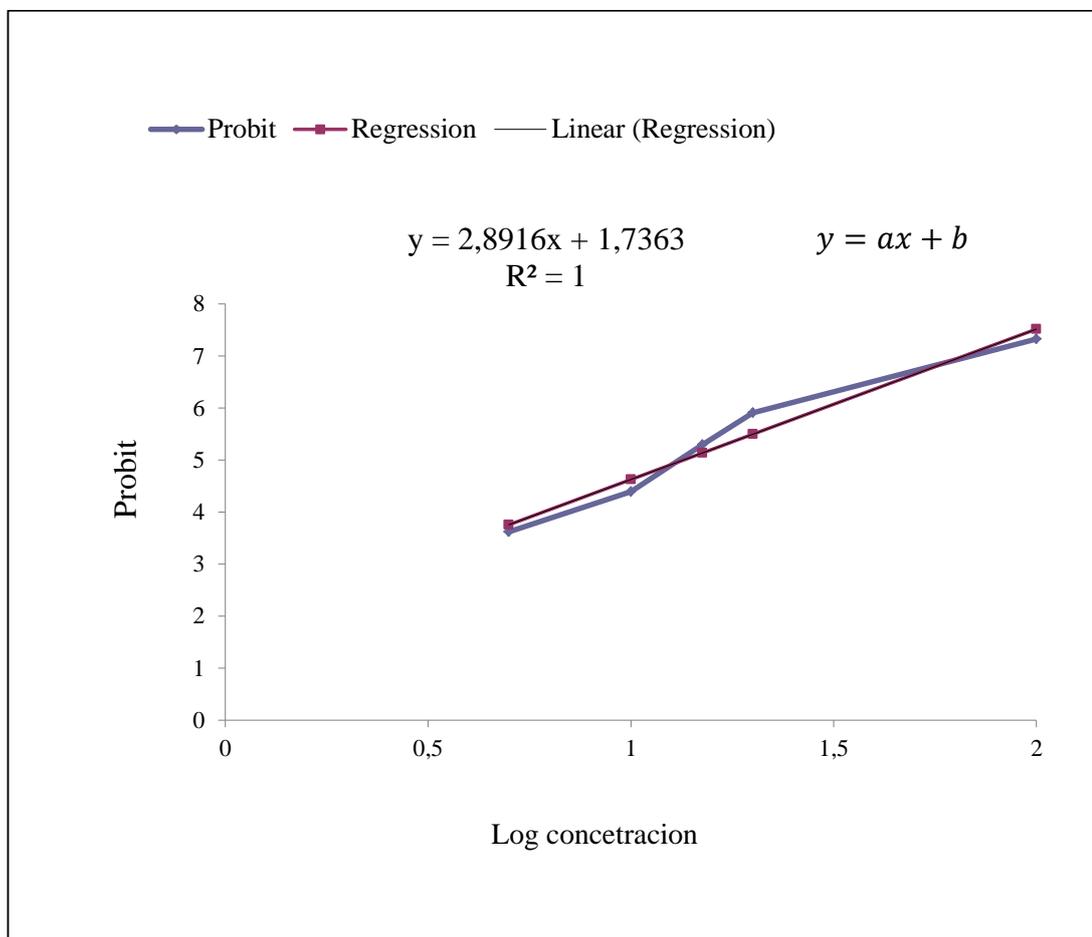
For Plotting		
log concent	probit	regression
0,70	3,62	3,76
1,00	4,40	4,63
1,18	5,29	5,14
1,30	5,91	5,50
2,00	7,33	7,52

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

GRÁFICO N° 1

Probit vs log de la concentración para determinar la LC₅₀



Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N° 20

Datos sobre las condiciones que se establecen para el gráfico encontrándose la LC₅₀ por Método Probit

pendiente	2,89	logLD50=	1,13
intersepcion	1,74	LC50=	13,45

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

Tanto el valor de 2.89 correspondiente a la pendiente de la recta como la intersección corresponden a los valores que nos da la ecuación de la gráfica con la línea de regresión.

Por lo tanto empleando el método Probit se obtuvo un valor de **CL₅₀= 13.45 ppm** para la diversas exposiciones de dicromato de potasio en un periodo de 24 horas. Obteniéndose en el mismo gráfico la ecuación de regresión lineal que nos permitirá conocer la concentración en relación al logaritmo base 10.

Calculo de la CL50 por método Probit EPA

Este cálculo se lo realizo empleando el software que provee la EPA y con reconocimiento fidedigna para las organizaciones internacionales relacionadas con el cálculo de la concentración letal media.

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES Version 1.5					
ARTEMIAL					
Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted proportion Responding
5.0000	43	1	0.0233	0.0233	0.0294
10.0000	33	9	0.2727	0.2727	0.2864
15.0000	36	24	0.6667	0.6667	0.5840
20.0000	36	26	0.7222	0.7222	0.7772
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				=	1.727
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				=	5.991
Mu	=	1.127941			
Sigma	=	0.226919			

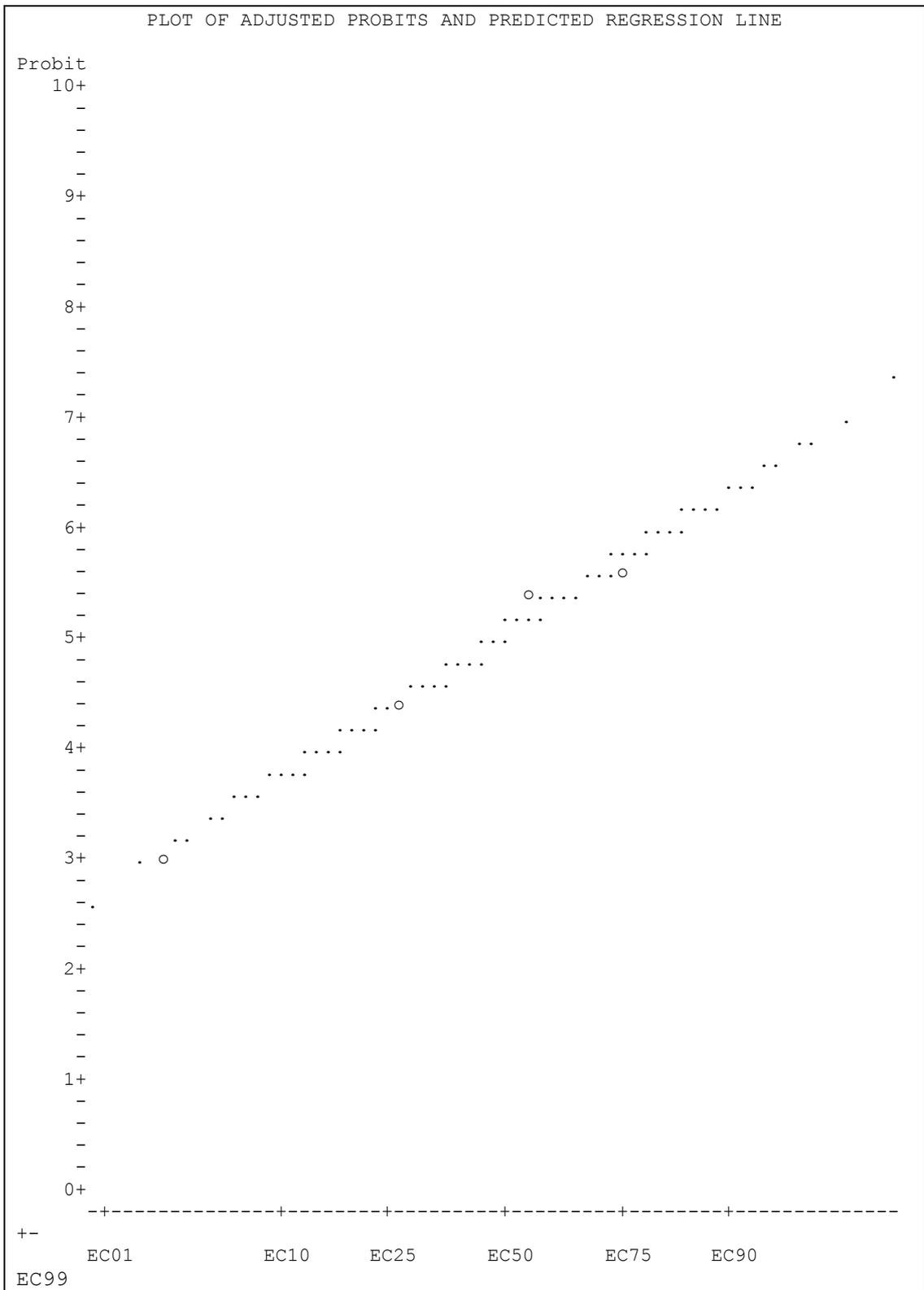
Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	0.029322	0.771059	(-1.481953,	1.540597)
Slope	4.406858	0.683987	(3.066244,	5.747473)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Lower	Limits Upper
LC/EC 1.00	3.982	2.326	5.358
LC/EC 5.00	5.684	3.847	7.099
LC/EC 10.00	6.873	5.015	8.275
LC/EC 15.00	7.812	5.983	9.199
LC/EC 50.00	13.426	11.803	15.380
LC/EC 85.00	23.074	19.368	30.916
LC/EC 90.00	26.228	21.504	36.930
LC/EC 95.00	31.710	25.038	48.194
LC/EC 99.00	45.271	33.144	79.795

Elaborado por: Software EPA Probit Analysis Program version 1.5



Elaborado por: Software EPA Probit Analysis Program version 1.5

Mediante este programa se obtuvieron varios valores como la concentración letal media, concentración inicial, con los valores máximos y mínimos de concentraciones que se pueden exponer, con una confianza del 95%, recalando que entre mayor sea la homogeneidad de los individuos expuestos el resultado será mucho más exacto, en nuestro caso al tener una variabilidad considerable en los individuos expuestos a cada concentración se obtuvo un resultado de **13.426 ppm** como valor a concentración letal media.

9.3.1.2. Evaluación estadística por el método Reed Muench

Para este método de evaluación estadística, existen dos formas, la primera a realizar es con valores corregidos acumulados de individuos muertos en el ensayo realizado. Este método realizado en las hojas de cálculo de Microsoft Excel 2013 nos da resultados reflejados en porcentajes y gráficos, para mediante el modelo matemático establecido se determine la concentración letal media, la cual va relacionada con el logaritmo de dicho valor del gráfico de la curva obtenida.

TABLA N°21

Datos que se obtuvieron en el ensayo realizado con concentraciones de dicromato de potasio sobre Artemia salina

Grupos / repeticiones	Muertas			Efecto Subletales			Vivas			Total		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Control	0	0	0	1	0	0	10	10	12	11	10	12
5ppm	1	0	0	2	4	3	9	12	12	12	16	15
10ppm	3	3	3	3	6	3	5	3	4	11	12	10
15ppm	8	7	9	4	4	2	1	1	0	13	12	11
20ppm	9	8	9	2	3	3	0	0	2	11	11	14

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N° 22

Valores corregidos acumulados de los datos anteriores

Valores acumulados corregidos								
total	mueritos	vivos	vivos acu	muerte acu	total ac	% muert ac	% muerte ac corr	Concentracion K2Cr2O7 ppm
33	0	33	121	0	121	0,000	0,000	0
43	1	42	88	1	89	1,124	1,124	5
33	9	24	46	10	56	17,857	17,857	10
36	24	12	22	34	56	60,714	60,714	15
36	26	10	10	60	70	85,714	85,714	20

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

CUADRO N° 2

Valores extrapolados de la concentración y el porcentaje de mortalidad para el primer grafico

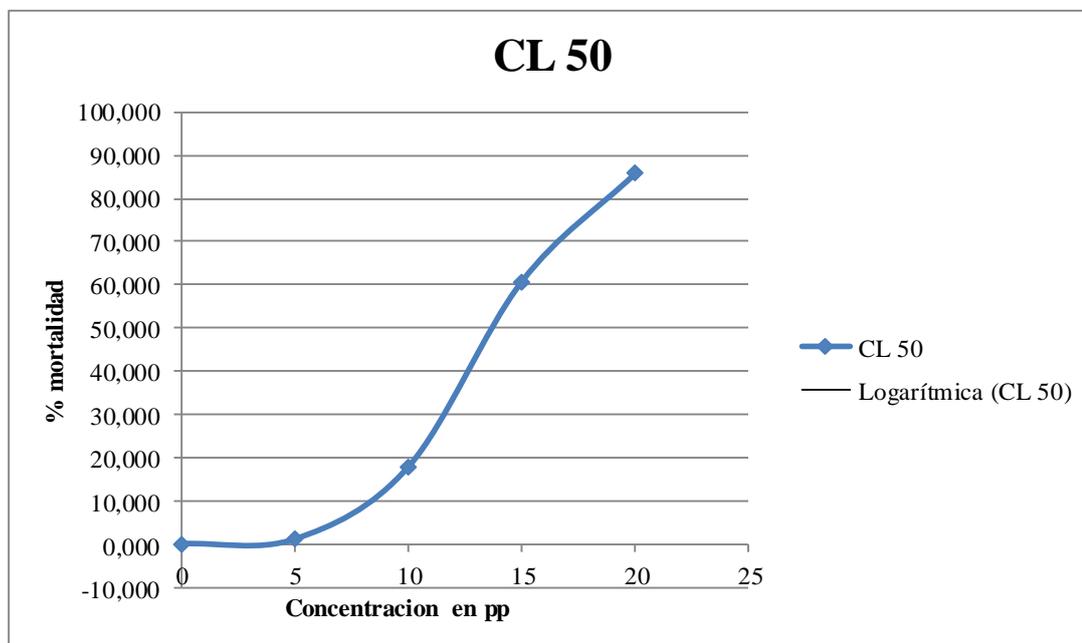
Concentracion K2Cr2O7 ppm	% mortalidad
20	85,714
15	60,714
10	17,857
5	1,124
0,1	0

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

GRÁFICO N° 2

Valores Extrapolados %Mortalidad Vs Concentración Del Dicromato De Potasio



Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

Después la gráfica obtenida mediante el empleo de la hoja de cálculo se da solución a las siguientes ecuaciones:

TABLA N° 23

Modelo matemático del método de Reed Muench (IIFB, 2010)

Método Red Munch			
$\log CL50 = \text{Log dosis inferior} + B \times \text{Log } A$			
$A = \text{dosis superior} / \text{dosis inferior}$			
$A = 20/5 =$	4		

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N°24

Cálculo del valor de la incógnita B

CON VALORES CORREGIDOS ACUMULADOS	
$B = (50 - \% inferior) / (\% superior - \% inferior)$	
$B = (50 - 0) / (85.714 - 0) =$	0,58333

Fuente: Datos recolectados en la investigación
Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N° 25

Reemplazo de la ecuación del modelo matemático del método de Reed Muench

Reemplazando:	
$\log CL50 = \text{Log } 5 + 0.58333 \text{ Log } 4$	
$\log CL50 =$	1,05018
CL50 =	11,22

Fuente: Datos recolectados en la investigación
Elaborado por: Autores de la tesis.

- Segundo cálculo para la evaluación estadísticas de los resultados para la obtención de la concentración letal media, por el método de Reed Muench con valores corregidos no acumulados del porcentaje de mortalidad, dada a la aplicación del modelo matemático del método mencionado.

TABLA N° 26

Datos que se obtuvieron en el ensayo realizado con concentraciones de dicromato de potasio sobre Artemia salina

Grupos / repeticiones	Muertas			Efecto Subletales			Vivas			Total		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Control	0	0	0	1	0	0	10	10	12	11	10	12
5ppm	1	0	0	2	4	3	9	12	12	12	16	15
10ppm	3	3	3	3	6	3	5	3	4	11	12	10
15ppm	8	7	9	4	4	2	1	1	0	13	12	11
20ppm	9	8	9	2	3	3	0	0	2	11	11	14

Fuente: Datos recolectados en la investigación
Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N° 27

Valores corregidos Sin Acumular

valores corregidos sin acumular					
Total	muertos	vivos	% muert	%muer corr	concentracion de K2Cr2O7
33	0	33	0	0	0
43	1	43	2,325581	2,3255814	5
33	9	24	27,27273	27,2727273	10
36	24	12	66,66667	66,6666667	15
36	26	10	72,22222	72,2222222	20

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

CUADRO N° 3

Valores de concentración y mortalidad para el segundo gráfico

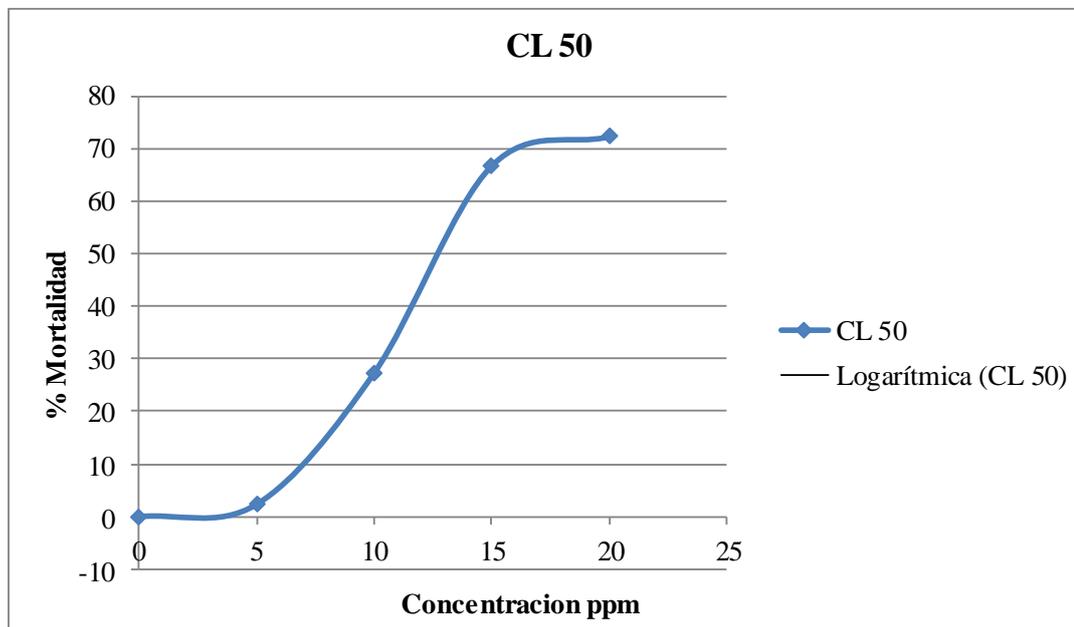
%mortalidad	concentracion de K2Cr2O7
0	0
2,3255814	5
27,2727273	10
66,6666667	15
72,2222222	20

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

GRÁFICO N° 3

%Mortalidad vs Concentración de Dicromato de Potasio



Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

Después de los gráficos mediante el empleo de la hoja de cálculo se da solución a las siguientes ecuaciones:

TABLA N° 28

Modelo matemático del método de Reed Muench

Metodo Red Munch			
$\log CL50 = \text{Log dosis inferior} + B \times \text{Log A}$			
$A = \text{dosis superior} / \text{dosis inferior}$			
$A = 20/5 =$	4		

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N° 29

Cálculo del valor de la incógnita B

CON VALORES CORREGIDOS SIN ACUMULAR	
$B = (50 - \% inferior) / (\% superior - \% inferior)$	
$B = (50 - 0) / (72.22 - 0) =$	0,692308

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

TABLA N° 30

Reemplazo de la ecuación del modelo matemático del método de Reed Muench

Reemplazando:	
$\log CL_{50} = \text{Log } 5 + 0.692308 \text{ Log } 4$	
$\log CL_{50} =$	1,11579
CL₅₀ =	13,06

Fuente: Datos recolectados en la investigación
Elaborado por: Autores de la tesis.

En el método de evolución estadística de Reed Muench se obtuvieron dos valores, uno considerando valores corregidos acumulados y otro sin acumularlos. Con el primero resultó una **CL₅₀= 11,22 ppm**; mientras que con el segundo caso se obtuvo una **CL₅₀=13,06 ppm**.

9.3.1.3. Evaluación estadística por el método estimación gráfica

Al igual que los métodos anteriores de evaluación estadística se empleó Microsoft Excel 2013 en el cual simplemente por método gráfico, empleando los datos obtenidos en el ensayo se determina un aproximado de la concentración letal media del Dicromato de potasio, dado al grafico lineal que se obtiene buscando la intersección en la dosis de 50%.

CUADRO N°4

Datos empleados y recogidos de los ensayos realizados con Artemia salina expuestos a concentraciones de Dicromato de potasio

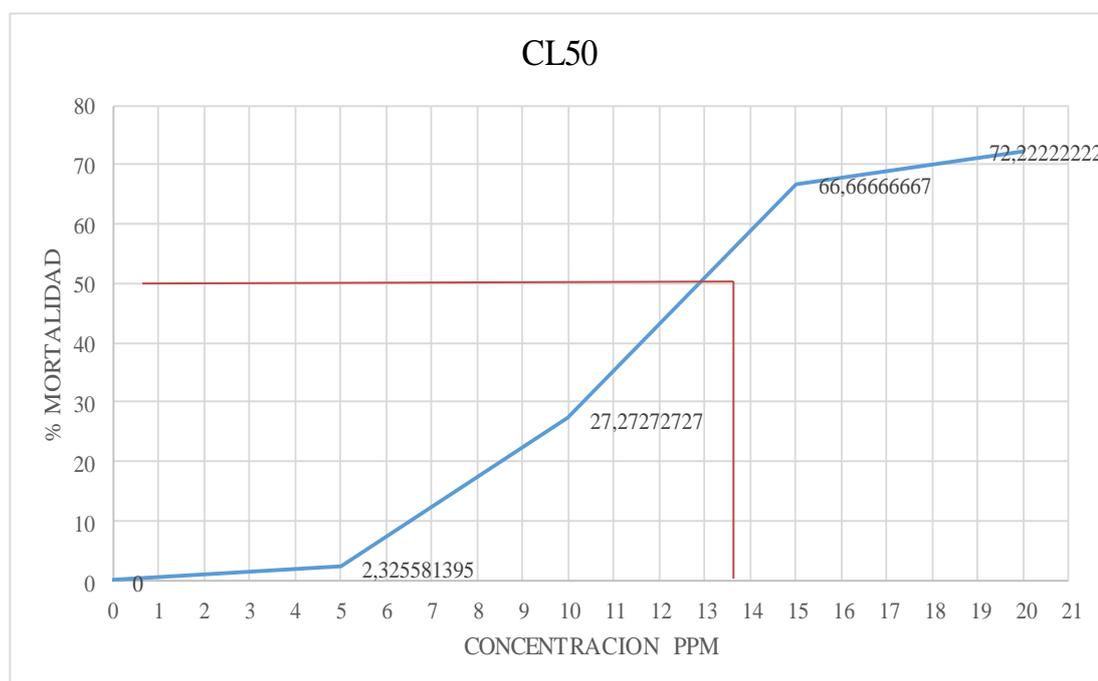
		Número de artemias vivas por caja petri					
Total artemias	Concentración K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg/l)	1	2	3	Total vivas	Total muertas	% Mort.
33	0	11	10	12	33	0	0
43	5	12	16	15	42	1	2,325581
33	10	11	12	10	24	9	27,27273
36	15	13	12	11	12	24	66,66667
36	20	11	11	14	10	26	72,22222

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

GRÁFICO N° 4

Representación de la CL₅₀ del dicromato de potasio



Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

Con el método de estimación gráfica el cual se denota por las líneas de intersección rojas se alcanzó una CL₅₀ = 12.9 ppm aproximado debido que este método es objetivo.

Dada a la existencia de algunos métodos estadísticos para calcular la CL₅₀, citadas en la literatura y respaldadas por organizaciones de prestigio como la US EPA que se han tomado de referencia, podemos comparar los resultados de cada uno de los métodos estadísticos empleados seleccionando el valor que consideremos próximo a los ya determinados en investigaciones realizadas durante la historia.

TABLA N° 31

Comparación de la Concentración letal media del dicromato de potasio por los diferentes métodos estadísticos

Comparacion de CL50 por diferentes metodos	
Método	CL 50
Probit excel	13,45
Probit software	13,426
Estimacion Grafica	12,9
Reed Muench (valores acumulados)	11,22
Reed Muench (Sin acumular)	13,06

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

La tabla nos indica que el valor considerado de los diversos métodos empleados para la determinación de la CL₅₀ es de 13,06 ppm.

Acerca de los efectos adversos que la *Artemia salina* y los nauplios de 24 h presentan una cutícula muy fina lo que las hace especialmente sensibles al tóxico (cromo VI), el cual penetra a través de las barreras fisiológicas absorbiéndose rápidamente y provocando diferentes alteraciones en estos organismos, que van desde efectos subletales sobre la movilidad, la reproducción y la hematología hasta la muerte de la larva.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DEL DICROMATO DE POTASIO SOBRE LA ARTEMIA SALINA

El propósito en ésta tesis es de establecer una sustancia patrón de referencia (dicromato de potasio) para ensayos ecotoxicológicos, hemos trabajado con tres métodos estadísticos para calcular la concentración letal media, los cuales son: método Probit, método de Reed Muench y método de estimación gráfica; siendo este último un método poco confiable, pero que nos ayuda para comparar resultados con el resto de métodos, y como se puede ver no se aleja mucho de la realidad; sin embargo, en los datos bibliográficos obtenidos de investigaciones ya realizadas tenemos una CL_{50} ya establecida con un valor de 12,5 mg/L. Por lo tanto el método que más se aproxima a éste dato mediante un cuadro comparativo es el de Reed Muench, trabajando con valores corregidos sin acumularlos, estableciendo para nuestro estudio un resultado de una concentración letal media del toxico como sustancia patrón dicromato de potasio $CL_{50} = 13,06 \text{ mg/l}$.

Cabe recalcar que en todos los métodos estadísticos empleados es notable que la tasa de mortalidad de las Artemias expuestas a la sustancia tóxica (dicromato de potasio) se incrementa conforme va aumentando la concentración del tóxico.

9.3.2. EFECTOS ADVERSOS DE LA EXPOSICIÓN DE LA ARTEMIA SALINA A DICROMATO DE POTASIO

Después del ensayo al someter a la Artemia salina a diferentes concentraciones de Dicromato de potasio, se obtiene la siguiente tabla en la que se resumen los efectos adversos notables a simple vista sin tener que enfocarse a un análisis biológico más profundo.

TABLA N° 32

Efectos adversos observados en la Artemia salina en cada una de las concentraciones de Dicromato expuestas.

Concentraciones de K ₂ Cr ₂ O ₇	Efectos adversos
Control	Todas se comportaron de manera normal en cada una de las repeticiones, observandose agilidad en el nado y estímulo a luz.
5ppm	Se observó en algunas larvas dificultades en la natación a las 24 h de exposición, mínima cantidad.
10ppm	Un mínimo porcentaje presentó notable disminución de la velocidad de desplazamiento en el nado y poca respuesta a los estímulos de luz.
15ppm	Un mínimo porcentaje presentó nado errático, nado superficial (barbeo), letargia, debilidad y pérdida del reflejo de huida.
20ppm	Los movimientos de la mayoría de los individuos presentes en cada vial a pocas horas de expuestos lucían lentos y cortos (letargia progresiva) hasta luego caer en el fondo del frasco de donde intentaban despegar sin éxito, presentándose posteriormente la muerte de los individuos (quietud total) luego de aproximadamente 18 horas.

Fuente: Datos recolectados en la investigación

Elaborado por: Autores de la tesis.

ANÁLISIS

La evaluación de las Artemias fue realizada mediante la observación del comportamiento de los animales expuestos y no expuestos, con posterior revisión a través del microscopio óptico de los individuos vivos y agonizantes. Para la evaluación de estos animales fueron tenidos en cuenta los siguientes factores: nado errático, nado superficial, debilidad y pérdida del reflejo de huida, color del animal, deformidades y manchas. Estas diferencias aunque no muy claras se mostraron a simple vista y se pueden observar de tal manera en las siguientes imágenes tomadas desde el microscopio.

Una de las principales características presentadas en los individuos expuestos al dicromato fue una notable disminución de la velocidad en el nado y una poca respuesta a los estímulos de luz empleándose concentraciones entre 5 mg/L y 20 mg/L. Transcurridas un lapso de 24 horas, los movimientos de la mayoría de los individuos presentes en cada vial lucían lentos y cortos conocido como letargia

progresiva, hasta quedar en el fondo de la caja Petri donde intentaban despegar sin éxito, presentándose posteriormente la muerte de los individuos (quietud total). A concentraciones por debajo de 10 mg/L fueron observados los mismos efectos pero en menor cantidad de individuos, encontrándose efectos letales a concentraciones de 13,06 mg/L luego de 24 horas de exposición.

9.4. ANALISIS DE VARIANZA ANOVA CON STATAGRAPHIC

ANOVA Simple - CL50 por METODO

CL50	METODO	DESCRIPCION
13, 06	A	METODO REED MUNCH
11, 22	A	METODO REED MUNCH
12,9	B	METODO ESTIMACION GR
13,45	C	PROBIT
13,426	C	PROBIT EPA
12,5	D	LITERATURA

Variable dependiente: CL50

Factor: METODO

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 4

El StatAdvisor

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para CL50. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de CL50 para los 4 diferentes niveles de METODO. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis

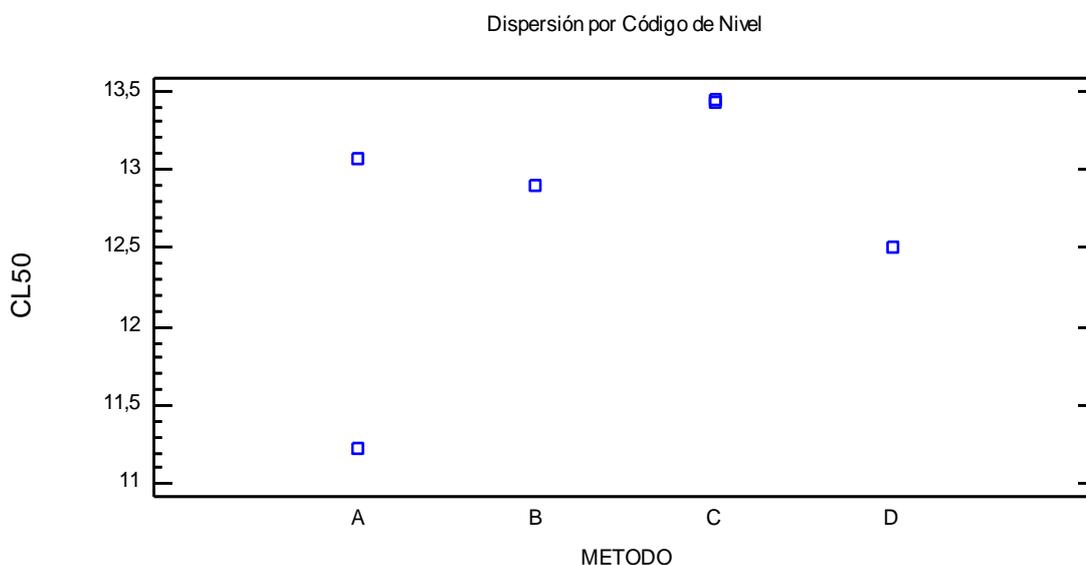
la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

Tabla N° 33
ANOVA para CL₅₀ por METODO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,77537	3	0,591788	0,70	0,6338
Intra grupos	1,69309	2	0,846544		
Total (Corr.)	3,46845	5			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de CL₅₀ en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,699064, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de CL₅₀ entre un nivel de METODO y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.



10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación puede concluirse que:

- Se determinó la toxicidad aguda de Dicromato de Potasio en Artemia Salina empleando una metodología simple rápida y de bajo costo, usando pruebas ecotoxicológicas, concluyendo que el compuesto nombrado como patrón es útil para estos ensayos debido al porcentaje de 35% cromo hexavalente en forma de dicromato es una sustancia toxica letal, que expuesto a bajas concentraciones, produjo efectos subletales y letales sobre el modelo biológico en un periodo corto, debido a la cutícula muy fina de los nauplios de Artemia que las hace especialmente sensibles al toxico absorbiéndolo rápidamente.
- El cromo hexavalente se encuentra en forma de cromatos y dicromatos, y el potencial impacto hacia el ecosistema, se debe a que son compuestos tóxico, que se encuentran en concentraciones tan bajas y en condiciones ambientales normales, siendo difícil su detección con los métodos químicos convencionales, por lo que los bioensayos detectan concentraciones mínimas de estos compuestos que desencadenan diversos efectos nocivos por bioacumulación, en especial a los ecosistemas acuáticos como la modificación de pH, temperatura, afectando el estado fisiológico y crecimiento de las Artemias , estableciéndose que la toxicidad del Dicromato en este sistema está condicionada por el grado de bioasimilación y por los mecanismos de defensa que se ven alterados al confundir cromatos y dicromatos por los canales iónicos como sulfatos llegando al núcleo de la célula.

- Se expuso a diferentes concentraciones de Dicromato de Potasio a la *Artemia Salina* empleada como modelo biológico alternativo en ensayos ecotoxicológicos, debido a que cumplió con características como: buena resistencia a las condiciones de laboratorio, proviene de áreas libres de contaminación, además se trata de una especie importante dentro de la cadena trófica, con mayor importancia el poseer una cutícula capaz de ser atravesada por la forma compuesta del cromo mas no como elemento, siendo los efectos tóxicos observados luego de la exposición del patrón a diferentes concentraciones, generados en proporción a la concentración sometida, y los efectos sobre la susceptibilidad de las larvas se ven relacionadas al tiempo de desarrollo; considerándose a la *Artemia salina* como una herramienta confiable y económica para la evaluación y desarrollo de bioensayos.
- Se determinó la concentración letal media (CL₅₀) del Dicromato de Potasio en *Artemia Salina* mediante algunos métodos matemático-estadísticos, esto para que la investigación tenga mayor validez y así poder relacionar los diferentes resultados de cada método, tomando el resultado obtenido por el Método de Reed Muench con un valor de CL₅₀ igual a **13,06 mg/L** para *Artemia salina* tras 24-h de exposición, lo que quiere decir que esa es la concentración a la cual muere la mitad de las especies expuestas al tóxico, sugiriéndose que es un compuesto potencialmente citotóxico e indica el grado de peligrosidad de los materiales que lo constituyen. Los efectos adversos que se pudieron observar fueron: letargia, poca reacción a la luz, debilidad y pérdida del reflejo de huida; los cuales son atribuidos principalmente a la presencia de metales y al efecto de envenenamiento.
- Se tabularon los resultados de los valores de CL₅₀ obtenidos mediante los diferentes métodos matemático-estadísticos empleándose el sistema de análisis de varianza ANOVA, concluyéndose que se puede considerar cualquiera de los valores como CL₅₀, debido a que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre un nivel de método y otro, dando un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto queda a consideración de quienes hicimos el trabajo, de escoger uno de ellos como el valor de CL₅₀, entonces en tal caso, escogimos el valor obtenido a partir del Método de Reed Muench

trabajando con valores sin acumular, el cual es de 13,06 ppm $K_2Cr_2O_7$, debido a que es el que más se acerca al valor ya obtenido en bioensayos anteriores (12,5 ppm $K_2Cr_2O_7$)

- Una vez implementado el laboratorio con sus respectivos equipos, accesorios, sustancias y reactivos se podrán realizar análisis ecotoxicológicos que beneficiarán no solo a la Carrera de Ingeniería Química, sino también a toda la Facultad y Universidad en general, esto ayudaría de una u otra manera a la acreditación de la Carrera.

10.2. RECOMENDACIONES

- Basado en los resultados de las CL_{50} de la sustancia patrón empelada dicromato de potasio, se sugiere que se debe tomar en cuenta el porcentaje de cromo hexavalente que este compuesto contiene para realizar ensayos más profundos de tal modo que se considere en la concentración máxima permisible para verter a un cuerpo de agua al medio, ya que esta tiene un rango amplio del toxico estudiado, llevando a que los organismos de los ecosistemas acuático son vulnerables al efecto de bioacumulación y a su vez a la biomagnificación que perjudica a la vez a los humanos.
- Los bioensayos de toxicidad deben aplicarse a diversos sectores industriales sobre todo las industrias que emplean el compuesto toxico tomado como referencia y en un futuro emplear diferentes sustancias patrones, con el fin de diagnosticar los posibles impactos ambientales negativos que se puedan ocasionar especialmente a los cuerpos de agua.
- Es importante seguir realizando bioensayos con los indicadores ambientales expuestos en este trabajo, con el fin de obtener una mayor referencia de la CL_{50} de los tóxicos peligrosos. De tal forma, que al obtener la información de las investigaciones se podrá modificar y crear una legislación ambiental más amplia que incluya a la ecotoxicología y a los bioensayos como un método de control estricto en los vertimientos y protección de la fauna y flora, asociados con los ecosistemas acuáticos.
- Se sugiere considerar los datos encontrados durante la investigación, con el propósito de que sirvan para nuevos estudios e investigaciones y se puedan comparar, determinando las posibles diferencias y sus causas, de esta manera se busca garantizar la preservación de los ecosistemas específicamente acuáticos, en un futuro.
- Se recomienda llevar a ejecución este mismo ensayo pero modificando el medio de reproducción o eclosión, en menores y mayores concentraciones de agua salada, pudiéndose emplear sales artificiales que venden en tiendas acuáticas, para lo que se conoce como agua de mar artificial ya que la *A. salina* tolera un rango amplio de salinidad.

- Se pueden establecer cambios en el ensayo descrito y propuesto de *Artemia salina* convencional como: número de organismos por placa, control de luz y temperatura en la eclosión de quistes, mayor control en la edad de nauplios, pudiéndose modificar la fase de estos utilizados en los ensayos, siempre y cuando se recuerde que no deben llegar a la etapa adulta total.
- Es recomendable profundizar en los efectos fisiológicos causados por la exposición al material en estudio, mediante la examinación histopatológicas de órganos de la *Artemia*, con el fin de reconocer de una manera más concreta el mecanismo de acción toxica del dicromato de potasio. De igual manera es recomendable realizar estos estudios utilizándose otros modelos biológicos, que permitan tener una idea más amplia sobre los efectos en el ecosistema.
- Se recomienda trabajar con todos los métodos estadísticos que existan, evitando una variabilidad significativa entre los individuos expuestos, logrando un acercamiento a los valores reales existentes sobre la concentración, establecidos en investigaciones anteriores. Por ejemplo; el valor de CL₅₀ establecido es de 12,5 mg/L; en nuestro caso el método que más se acercó a éste valor fue el de Reed Muench con el cual se determinó un valor de CL₅₀= 13,06 mg/L.
- Se recomienda utilizar el software Statgraphics Centurion para poder analizar la variabilidad de los valores obtenidos de CL₅₀ obtenidos a partir de los diferentes métodos empleados, lo cual hará que haya un mayor porcentaje de confianza al momento de arrojar los resultados y por ende el análisis de variabilidad, que indica si hay o no una diferencia estadísticamente significativa entre un valor y otro.
- El material utilizado en cualquier fase del ensayo debe ser lavado con abundante agua (no usar jabones, ni nada que altere la veracidad de los resultados), de preferencia esterilizados por autoclaves y luz ultravioleta ya que estos organismos son sensibles a cualquier olor y modificación en el medio. Garantizando de esta manera que no existirá contaminación por sustancias ajenas en medio de cultivo, agua salada, entre otros. Al igual que los reactivos que se utilicen durante el proceso de bioensayo, deben ser

analíticos y de marca reconocida, para garantizar que las soluciones sean de calidad y que no varíen los resultados alteración de estos.

11. SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD

11.1. SUSTENTABILIDAD

Para sustentar la propuesta principal es necesario conocer que actualmente nuestra Universidad está buscando ascender educativamente, en donde no solo ya basta la teoría que se da en las aulas de clases, sino que se debe ir más allá, se trata del campo de investigación y la experimentación, donde se busca formar grandes profesionales capaces de adaptarse a las nuevas tecnologías y capaces de utilizar con facilidad grandes equipos con los que se puede hacer grandes experimentos, lo cual sería un gran aporte a la Ciencia.

Quienes participamos de los ensayos ecotoxicológicos para poder continuar con la tesis, aseguramos que sin la implementación de los nuevos equipos para el laboratorio de ecotoxicología, no hubiese sido posible la realización de ella (tesis).

Así mismo estamos seguros que nuestra investigación contribuirá con el desarrollo académico y técnico no solo de la Carrera de Ingeniería Química sino también de la Universidad en general.

Hay que resaltar que también será de gran aporte para la Ecotoxicología en nuestra Universidad ya que es uno de los primeros bioensayos de este tipo que se realiza en los laboratorios del alma mater. Además se conoce que nuestra carrera está un poco limitada en cuanto a las investigaciones en general, debido a la falta de equipos nuevos tecnológicos-científicos. Pero en nuestro caso gracias a la gestión de las autoridades para obtener los equipos necesarios, pudimos resolver sin ningún problema los bioensayos.

Nuestra Carrera se relaciona, no directamente pero sí en gran proporción, con el campo de la ecotoxicología, sobre todo cuando se trata de bioacumulación, que no es otra cosa que la acumulación de sustancias tóxicas a lo largo de la cadena trófica. Entonces como el dicromato de potasio es considerado tóxico, y además su adquisición no es restringida, se lo eligió como nuestra sustancia a utilizar en los bioensayos para nuestra tesis. En investigaciones posteriores se podrán utilizar otras sustancias comunes consideradas tóxicas para los seres humanos.

11.2. SOSTENIBILIDAD

Quienes integramos el grupo de egresados de la carrera de ingeniería química de la Universidad Técnica de Manabí como autores de dicho proyecto, consideramos que los bioensayos realizados en nuestra tesis tendrán mucha importancia porque serán la base para posteriores investigaciones dentro de nuestra carrera, siempre y cuando se vaya adquiriendo nuevos equipos innovadores con nuevas aplicaciones para grandes ensayos. Nuestra Universidad, sobre todo nuestra Carrera será una carta de presentación a nivel local, nacional e incluso internacional, en cuanto a la investigación en el campo ecotoxicológico.

Para alcanzar con éxito futuras investigaciones es necesario que los docentes se sigan preparando en éste campo para así ellos puedan llegar a sus estudiantes con información actualizada, ya que sabemos que la tecnología y ciencia avanzan muy rápidamente.

PRESUPUESTO

TEMA DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO:

DETERMINACIÓN DE DICROMATO DE POTASIO COMO PATRÓN EN ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE ARTEMIA SALINA. UTM 2013

ENTIDAD: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

POSTULANTES: Almeida Zambrano Jorge Alfredo, Garay Quiroz Fulton Rolando, Quimis Chiquito Johanna Lisette, Rizzo Ponce Jenniffer Belén

VALORES EJECUCION DE TESIS

ÍTEM	Concepto	Cant	Precio Unitario	Precio Total	Precio total / 4 (autor)	Especificaciones
1	Implementación de equipos de laboratorio	1	\$ 12.000,00	\$ 12.000,00	\$ 3.000,00	equipos para el laboratorio de ecotoxicoología
2	Internet	125	\$ 0,80	\$ 100,00	\$ 25,00	
3	Impresión de tesis	1740	\$ 0,08	\$ 139,20	\$ 34,80	Cantidad en hojas aproximadas
4	Copias	500	\$ 0,02	\$ 10,00	\$ 2,50	
5	Materiales para ensayos	1	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 45,00	Varios implementos para ejecutar el ensayo
6	Transporte		\$ 220,00	\$ 220,00	\$ 55,00	Todo tipo de movilizacion empleada
7	Análisis		\$ 100,00	\$ 100,00	\$ 25,00	
8	Empastado de Tesis	4	\$ 15,00	\$ 60,00	\$ 15,00	Unidades
9	Sustentación		\$ 200,00	\$ 200,00	\$ 50,00	
10	Varios		\$ 92,00	\$ 92,00	\$ 23,00	
Sub Total				\$ 13.101,20	\$ 3.275,30	

Son: trece mil ciento un dólares con veinte centavos en total, aportando tres mil doscientos setenta y cinco dólares con treinta centavos por cada estudiante.

Almeida Zambrano Jorge Alfredo

Garay Quiroz Fulton Rolando

Quimis Chiquito Johana Lissette

Rizzo Ponce Jenniffer Belén

CRONOGRAMA VALORADO

Actividades	MESES																								
	Oct.	Nov.				Dic.				Ene.				Feb.				Mar.				Abr.			
	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Aprobación del Anteproyecto.	*																								
Investigación bibliográfica y recolección de la información teórica.		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
Pedido de los equipos						*																			
Pedido de Cambio de Director de Tesis							*	*	*																
Aprobación de Cambio de Director											*														
Reunión con miembros de tribunal											*						*	*	*						
Reunión con director de tesis		*				*					*					*	*	*							
Presentación de Primer Avance											*														
Llegada de los equipos												*													
Realización de ensayos ecotoxicológicos en el laboratorio												*	*	*	*	*	*								
Obtención de la concentración letal media del dicromato de potasio																	*	*							
Presentación del segundo avance																	*								
Correcciones de Tesis																		*	*	*					
Elaboración y presentación del informe final de investigación.																					*				

BIBLIOGRAFÍA

1. Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente, Libro VI (Decreto Ejecutivo N° 3516 2 de Marzo de 2003).
2. Ley de Gestión Ambiental (2004).
3. Constitución de la República del Ecuador . (2008). ECUADOR.
4. Albert, L. A. (2002). Cromo. En C. 14, *Curso básico de toxicología ambiental* (págs. 227-244).
5. Álvarez, Raquel. S. (2002). *Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de Artemia* . Obtenido de Universidad de Valencia , Facultad de Ciencias Biológicas: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9485/TesisRaquel.pdf?sequence=1>
6. Aportela, P. y González Y. (2001), Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de Artemia salina, Anuario Toxicología. Vol 1, 1: 104-8.
7. ATSDR. (14 de ABRIL de 2006). *CROMO*. Recuperado el 2014, de <http://www.atsdr.cdc.gov/es/>: www.lemona.biz/CROMO-1/CROMO%20informe%20toxicidad.pdf
8. Baird., C. (2013). *WIKIPEDIA*. Recuperado el Enero de 2014, de Editorial Reverté: http://es.wikipedia.org/wiki/Qu%C3%ADmica_ambiental
9. Bartolomé y Rodríguez, (2007). Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre Artemia franciscana. Rev. Lat. de Recur. Nat., 3 1: 90-97
10. Bernal, P. Alba., & Rojas, A. Andrea. (2007). *Determinación De La Concentración Letal Media CL50-48 del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphniapulex*,. Obtenido de Universidad De La

Salle, Facultad De Ingeniería Ambiental:
<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/14946/1/41012014.pdf>

11. Blogueiros. (Junio de 2010). *Artemia salina*. Obtenido de Blogueiros. Axena:
<http://blogueiros.axena.org/wp-content/uploads/2010/06/artemia-salina.jpg>
12. Botanical OnLine. (2010). *Como es la alimentacion de la Artemia Salina*. Obtenido de La Artemia: http://www.botanical-online.com/animales/alimentacion_artemia.htm
13. Botanical Online. (2010). *LA ARTEMIA*. Obtenido de CARACTERISTICAS:
http://www.botanical-online.com/politica_de_uso.htm
14. Botanical-Online. (2010). *Artemia Ficha*. Obtenido de botanicalonline.com:
http://www.botanical-online.com/animales/artemia_ficha.htm
15. Botanical-Online. (2010). *Cria de La Artemia* . Obtenido de La Artemia :
http://www.botanical-online.com/animales/cria_artemia.htm
16. Bowen, S. T. (1985). Journal of Crustacean Biology. En "*Ecological isolation in Artemia: Population differences in tolerance of anion concentrations.*" (págs. 106-126).
17. Bowen, S. T. (1988). *Artemia* habitats: Ion concentrations tolerated by one superspecies.". En *Hydrobiologia 158* (págs. 201-214).
18. BuenasTareas. com. (Diciembre de 2011). *Artemia* . Obtenido de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Artemia/3260793.html>
19. Brito, R, Gelabert, R. & Jimenez, J (2006), Efectos tóxicos del Niquel y el Zinc en *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). Universidad y ciencia, Vol. 22. 001: 65-74
20. CALOW, P. 1993. Handbook of Ecotoxicology Vol 1 y 2. Londres. Ed. BalckwellSc, p. 132-144.
21. CARBALLEIRA, A; ABOAL, J. 2000. Bancos de Especimenes Ambientales.

22. Cyclopedia.net. (2004). *Método de Reed y Muench*. Obtenido de <http://es.cyclopaedia.net/wiki/Metodo-de-Reed-y-Muench-1>
23. Davis, Dulbecco, Einten, Ginsberg. (1990). *Titulación Viral por el Método de 50%*. Obtenido de Curso de Técnicas de Diagnóstico en Virología Animal: http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/vetenfinftripodcomar/8TIT.htm
24. Del Ramo, J., Diaz, J., Varo, I., Sarabia, R., Torreblanca, A. (2002), Comparing the acute response to cadmium toxicity of nauplii from different populations of *Artemia*. *Environ. Tox. and Che.* Vol. 21, 2: 437–444
25. Ed.Morales, C. (2004). *Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
26. Encured . (Junio de 2013). *Dicromato de Potasio*. Obtenido de http://www.ecured.cu/index.php/Dicromato_de_Potasio
27. Encured. (SEPTIEMBRE de 2011). *IGNICION*. Obtenido de <http://www.ecured.cu/index.php/Ignici%C3%B3n>
28. Epstein, S., Lester, M., Brown, O., & Pope, C. (1982.). *Hazardous waste in America*.
29. Escobar, M. P., & Londoño, P. R. (2009). *Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género Daphania*. Universidad de La Salle.
30. FAO. (2003). *Artemia Salina, Ciclo de vida*. Obtenido de [fao.org/Images: http://www.fao.org/docrep/field/003/AC410S/AC410S12.gif](http://www.fao.org/docrep/field/003/AC410S/AC410S12.gif)
31. FAO, Departamento de Pesca. (1989). *Cultivo de Artemia salina*. Obtenido de La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm>

32. FIBAO, F. P.-A. (2008). *Especies Reactivas De Oxígeno (ROS)*:. Obtenido de TÉRMINO DEL GLOSARIO : <http://medmol.es/glosario/105/>
33. Gajardo, G. B. (2001). Heredity 87. En "International study on Artemia. LXII. Genomic relationships between Artemia franciscana and A. persimilis, inferred from chromocentre numbers." (pág. 187).
34. Global Foundation for Democracy and Development. (2014). *Diccionario Enciclopedico de Medio Ambiente*. Obtenido de Término actividad antrópica: <http://www.dominicanaonline.org/diccionariomedioambiente/es/definicionVer.asp?id=32>
35. Griffiths, G. a. (1978).
36. Güette, J., Olivero, J. & Stashenko, E. (2009), Acute toxicity against Artemia franciscana of essential oils isolated from plants of the genus Lippia and Piper collected in Colombia. Bol. Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas Vol. 8, 5: 419 – 427
37. Guevara, Diana. (OCTUBRE de 2010). *BIORREMOCIÓN DE CROMO (CROMO TOTAL Y CROMO VI) EN AGUA SINTÉTICA POR DOS INÓCULOS BACTERIANOS NATIVOS COMPUESTOS, A ESCALA DE LABORATORIO* . Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2611/1/T-ESPE-030039.pdf>
38. GUIAR, G. d. (1999). *Probit*. Obtenido de http://www.unizar.es/guiar/1/Accident/An_conse/Probit.htm
39. Gutiérrez, F., & Cervantes, C. (2008). *Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico*;. Ide@s CONCYTEG.
40. Hossain, M., Kumita, M., Michigami, Y., & Mori, S. (2005). Adsorption 11;. En *Optimization of Parameters for Cr (VI) Adsorption on used black tea leaves*; (págs. 561-568). University of Chittagong.

41. Hoyos, C. L. (1995). *Estandarización de bioensayos con Daphnia magna para la evaluación de toxicidad en aguas contaminadas*. Universidad Nacional de Colombia.
42. INECC. (Agosto de 2009). *Instituto Nacional de Ecología y cambio Climático, México*. Recuperado el 2014, de SEMARNAT: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/766-sqre-eco>
43. ISTAS. (s.f.). *Algunos compuestos químicos y nocivos para el hombre y el medio*. Obtenido de Daños para el medio ambiente y salud humana: <http://www.istas.net/fittema/att/fl5.htm>
44. Jaramillo, B., Muñoz, K. & Olivero, J. (2007), Composición química volátil y toxicidad aguda (CL50) frente a Artemia salina del aceite esencial del Croton malambo colectado en la costa norte colombiana, Sci. et Tec. año XIII, 33: 299-302
45. Kaiser, K., & Palabrica, V. (1991). *Photobacterium phosphoreum toxicity data index*. Water Pollution Research Journal in Canada.
46. Lenntech. (1998). *Elementos, Cromo - Cr*. Obtenido de Lenntech.com: <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-periodica/Cr.htm>
47. López, M. L. (2009). *Determinación de la Concentración Letal Media (CL50-48) del Cloro en el Efluente de una Industria Tipo Mediante Bioensayos de Toxicidad Acuática Utilizando Daphnia Pulex*. (U. D. BOGOTÁ, Ed.) Recuperado el 2013, de REPOSITORIO LA SALLE: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/14900/1/T41.09%20L881d.pdf>
48. Maldonado M, Gloria. Y. (2008). *Determinación de la concentración letal media (cl50-48) de los vertimientos de cadmio y cinc de una industria galvánica mediante pruebas toxicológicas*. Recuperado el 2014, de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/14072/1/T41.08%20M293d.pdf>

49. Mayorga, S. (2001). Microbioensayos ecotoxicológicos para monitoreo ambiental. *II Congreso Nacional de Ingeniería* (págs. 5-6). Guatemala: Servicios y Productos Ambientales (SEPRA).
50. MSDS, M. S. (Mayo de 2013). *Hoja de seguridad Dicromato de Potasio*. Obtenido de Bioseguridad: <http://www.gorgas.gob.pa/bioseguridad/MSDS-O-DICROMATO%20DE%20POTASIO-7778-50-9.pdf>
51. Naturephoto . (s.f.). *brine shrimp*. Obtenido de <http://www.naturephoto.cz/photos/others/brine-shrimp-90515.jpg>
52. NJDHSS, N. J. (2013). *DICROMATO DE POTASIO*. Recuperado el ENERO de 2014, de HOJA INFORMATIVA SOBRE SUBTANCIAS PELIGROSAS:
<http://www2.udec.cl/matpel/sustanciaspdf/d/DICROMATODEPOTASIO.pdf>
53. Nuñez, C. (Agosto de 2007). *Sustancias Patrones de Referencia*. Obtenido de <http://www.cenunez.com.ar/archivos/49-Sustanciaspatronesydereferencia.pdf>
54. Onsalud. (Enero de 2014). *Cromato*. Obtenido de Diccionario en línea: <http://www.onsalus.com/diccionario/cromato-cro42-150/6926>
55. Orozco H, Juliana & Toro B, Ángela, (2008), *Determinación de la Concentración Letal Media (CL50- 48) del Cromo y el Cobre por Medio de Ensayos de Toxicidad Acuática Sobre Daphnia pulex*, Universidad de La Salle, Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria.
56. Paggi, J. C., & de Paggi, S. J. (s.f.). *Daphnia magna el canario de las aguas*. Obtenido de Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Instituto Nacional de Limnología (INALI)-Santo Tomé (Santa Fe).
57. Pino, P., & Jorge, L. F. (Septiembre de 2009). *ENSAYO DE ARTEMIA: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES*. Obtenido de Revista de Protección Vegetal:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522010000100008&script=sci_arttext

58. Portalpez Biblioteca. (2008). *Morfología y Ciclo Vital*. Recuperado el 2014, de La Artemia Salina: <http://biblioteca.portalpez.com/la-artemia-salina-vp15740.html?highlight>
59. PRATT, C. Y. (1989).
60. Puig, A. (2010). *Bioindicadores*. Obtenido de Enciclopedia: <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Bioindic.htm>
61. Puig, A. (2010). *Ecotoxicología*. Obtenido de Enciclopedia: <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Ecotoxicol.htm>
62. Reed y Muench. (2002). Obtenido de <http://books.google.es/books?id=6-kqAAAAYAAJ&pg=PA99&dq=M%C3%A9todo+de+Reed+y+Muench&hl=es&sa=X&ei=vYSzUvrJA6uV7AabzYGYDg&ved=0CCUQ6AEwAQ#v=onepage&q=M%C3%A9todo%20de%20Reed%20y%20Muench&f=false>
63. Sensagent. (2013). *Organismo modelo*. Obtenido de sensagent.com: <http://diccionario.sensagent.com/Organismo%20modelo/es-es>
64. stanova.dvi. (2008). *Análisis de la Varianza con Statagaphic Plus*. Obtenido de http://www.est.uc3m.es/esp/nueva_docencia/leganes/ing_telecomunicacion/metodos_mejora_calidad/MEMC/doc_generica/Practicas/Guion_stanova.pdf
65. SUTER, G. (Londres). *Ecological risk assesment*. 1993: Lewis Pbl.
66. Torokne, A., Vasdinnyi, R., & Asztalos, B. (2007). *A Rapid Microbiotest for the Detection of Cyanobacterial Toxins*. Environ Toxicol.
67. TOXIMED. (s.f.). *Ecotoxicología*. Obtenido de Centro de Toxicología y Medicina: <http://www.santiago.cu/hosting/toximed/>
68. TULAS. (2003). LIBRO VI. En *CALIDAD AMBIENTAL* (pág. 288). QUITO.

69. UCDAVIS. (2010). *CROMO HEXAVALENTE*. Recuperado el 2014, de Environmental Toxicology: www.lemona.biz/CROMO-2/cromo%20hex
70. UNAL, U. N. (Agosto de 2000). *Agentes tóxicos que representan amenazas a largo plazo*. Obtenido de Ecología y Medio Ambiente: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000088/lecciones/seccion3/capitulo01/03_01_01.htm
71. UNSAM. (Octubre de 2009). *Los qué y cómo de la evaluación de riesgo toxicológico*. Obtenido de Universidad Nacional de San Martín: <http://www.unsam.edu.ar/secretarias/academica/newsletter/newsletter-2009-10-toxico.html>
72. Villamar, F. (1996) *Bioensayo de toxicidad (CL50) del dispersante de petróleo BP 1100 WD, con fitoplancton marino (Tetraselmis sp)*, *Ac oce del Pac*, 1: 65 – 73
73. WALKER, C.H. 1997: Principles of ecotoxicology. London. Ed Taylor y Francis, p. 160-182
74. WIKIPEDIA . (FEBRERO de 2014). *Hemolinfa*. Obtenido de DEFINICION : <http://es.wikipedia.org/wiki/Hemolinfa>
75. Wikipedia. (28 de NOVIEMBRE de 2013). *Bioacumulación*. Recuperado el ENERO de 2014, de Biomagnificación: <http://es.wikipedia.org/wiki/Bioacumulaci%C3%B3n>
76. Wikipedia. (10 de Febrero de 2014). *Dicromato de potasio*. Recuperado el 2014, de WIKIPEDIA: http://es.wikipedia.org/wiki/Dicromato_de_potasio

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO N° 1.- Quistes de Artemia Salina sin eclosionar.



ANEXO N° 2.- Eclosionador (para la reproducción de los quistes de Artemia).



ANEXO N° 3.- Con los recipientes de vidrio ámbar para almacenar los quistes de Artemia Salina.



ANEXO N° 4.- Esterilización con luz ultravioleta de los recipientes a utilizarse durante los bioensayos (15 min).



ANEXO N° 5.- Colocación de los quistes de Artemia en los recipientes de vidrio ámbar.



ANEXO N° 6.- Medición del pH (con papel tornasol) del agua destilada a utilizarse.



ANEXO N° 7.- Medición del pH (mediante el instrumento testo) del agua destilada a utilizarse.



ANEXO N° 8.- Medición de TDS (sólidos totales disueltos) del agua destilada para la primera reproducción.



ANEXO N° 9.- TDS del agua destilada a utilizarse para la primera reproducción (1 ppm).



ANEXO N° 10.- Pesado de la sal (comercial) que se utilizaría para la disolución con agua destilada.



ANEXO N° 11.- gramos de sal comercial a utilizarse para la disolución con agua destilada.



ANEXO N° 12.- Preparación de la solución de agua destilada con sal comercial.



ANEXO N° 13.- pH de la disolución con sal comercial (7,2).



ANEXO N° 14.- Medición de temperatura de la disolución con sal comercial.



ANEXO N° 15.- 600 ml de agua salada a utilizarse en el eclosionador para la posterior reproducción de los quistes.



ANEXO N° 16.- Llenado del agua salada en el eclosionador para la posterior reproducción de los quistes.



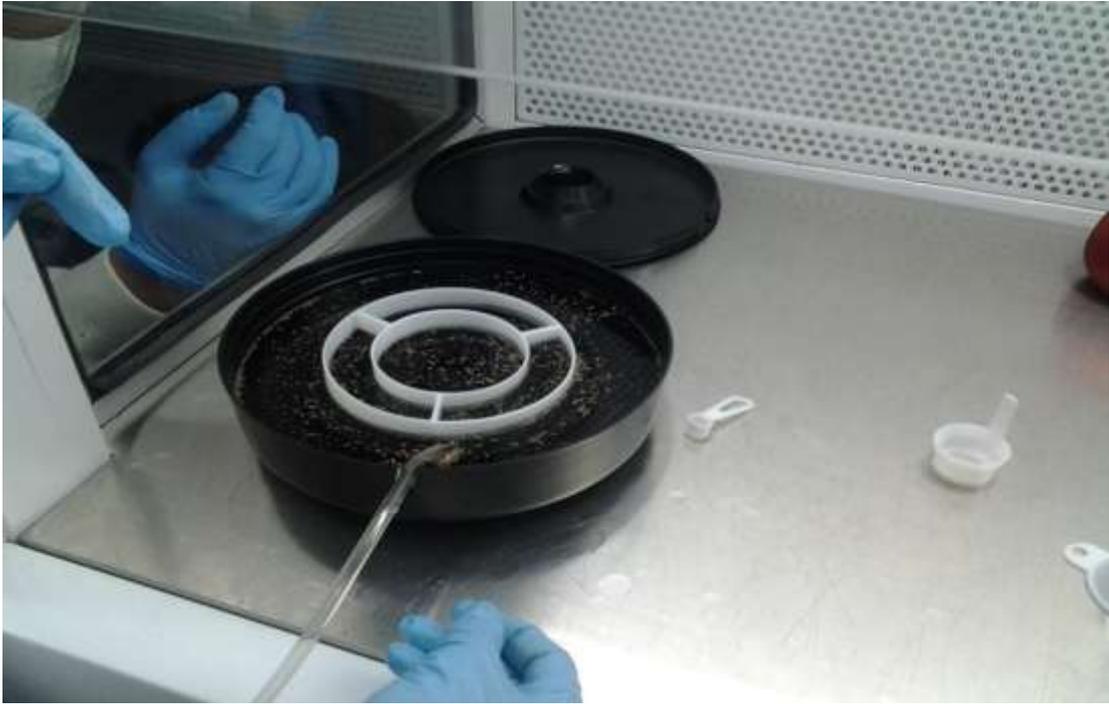
ANEXO N° 17.- Peso en gramos de los quistes de Artemia a utilizarse para la primera reproducción.



ANEXO N° 18.- Montado del dispositivo de incubación.- Suministración de aire (por medio de una bomba) hacia el eclosionador.



ANEXO N° 19.- Los quistes de Artemia llevados al eclosionador (primera reproducción).



ANEXO N° 20.- Incubación de los quistes de Artemia (24 horas) de la primera reproducción.



ANEXO N° 21.- Después de 24 horas, traspaso de los quistes ya eclosionados de la primera reproducción a un matraz.



ANEXO N° 22.- Artemias de primera reproducción ya en el matraz con las condiciones de vida adecuadas.



ANEXO N° 23.- Triturado de la sal gruesa a utilizarse para la disolución con agua destilada en la segunda reproducción.



ANEXO N° 24.- Pesado de la sal (en grano) que se utilizaría posteriormente para la disolución con agua destilada en la segunda reproducción.



ANEXO N° 25.- Pesado de la sal (en grano) que se utilizaría posteriormente para la disolución con agua destilada en la segunda reproducción.



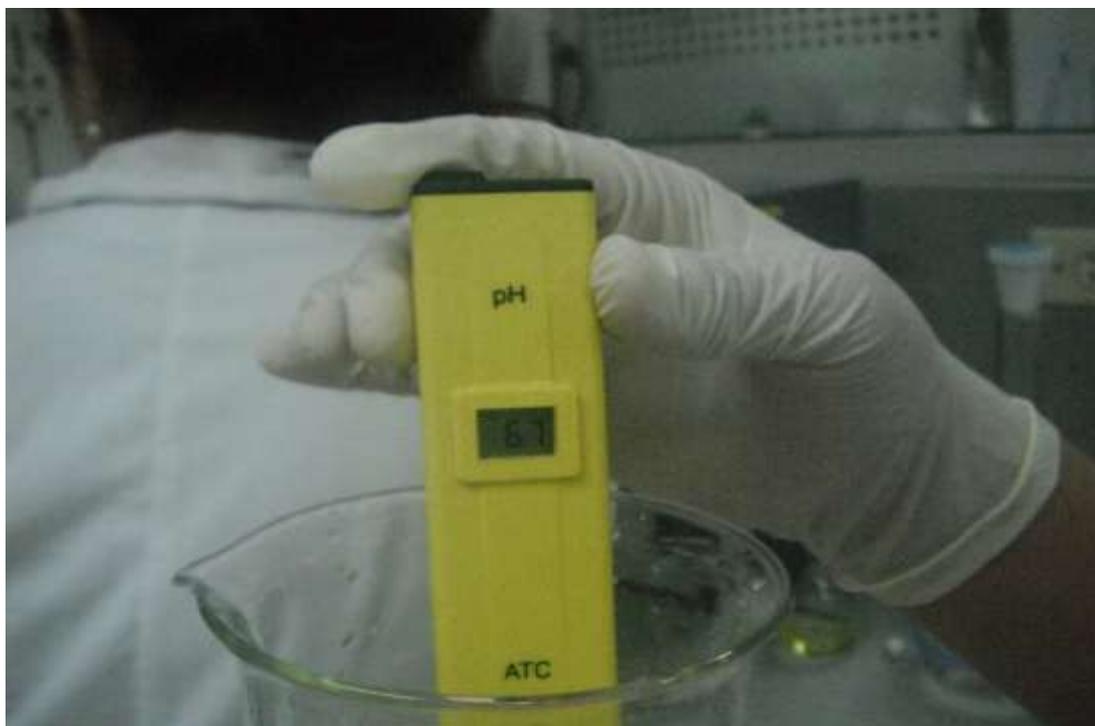
ANEXO N° 26.- gramos de sal en grano a utilizarse para la disolución con agua destilada.



ANEXO N° 27.- TDS del agua destilada a utilizarse para la segunda reproducción (0 ppm).



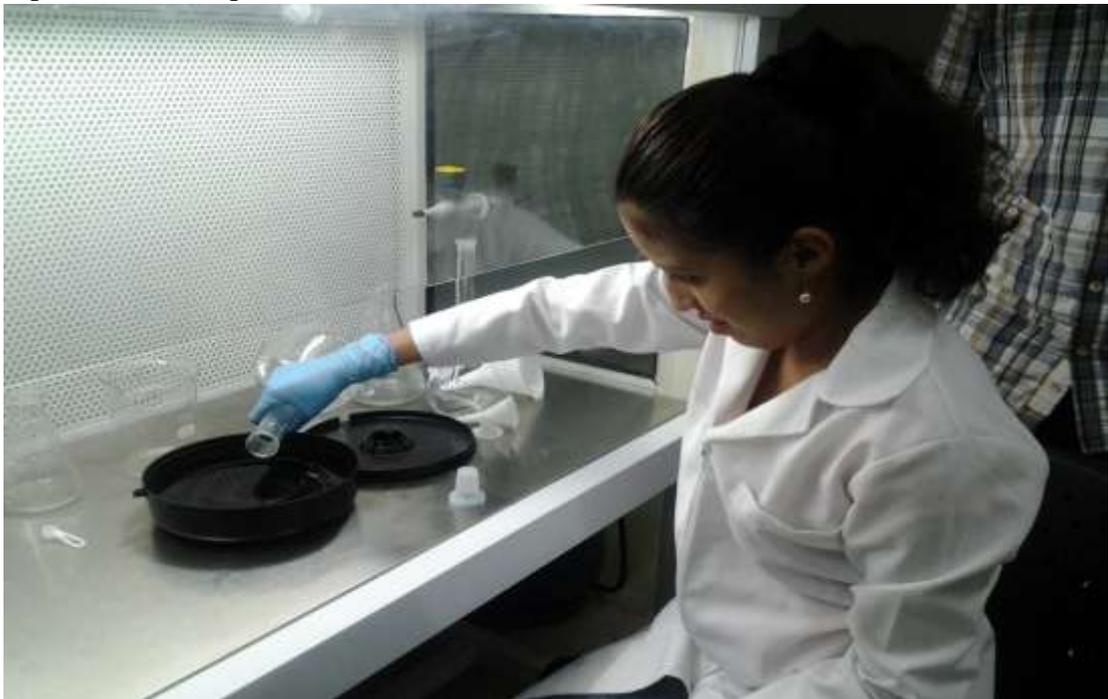
ANEXO N° 28.- pH de la disolución con sal en grano (6,7).



ANEXO N° 29.- Peso en gramos de los quistes de Artemia a utilizarse para la segunda reproducción.



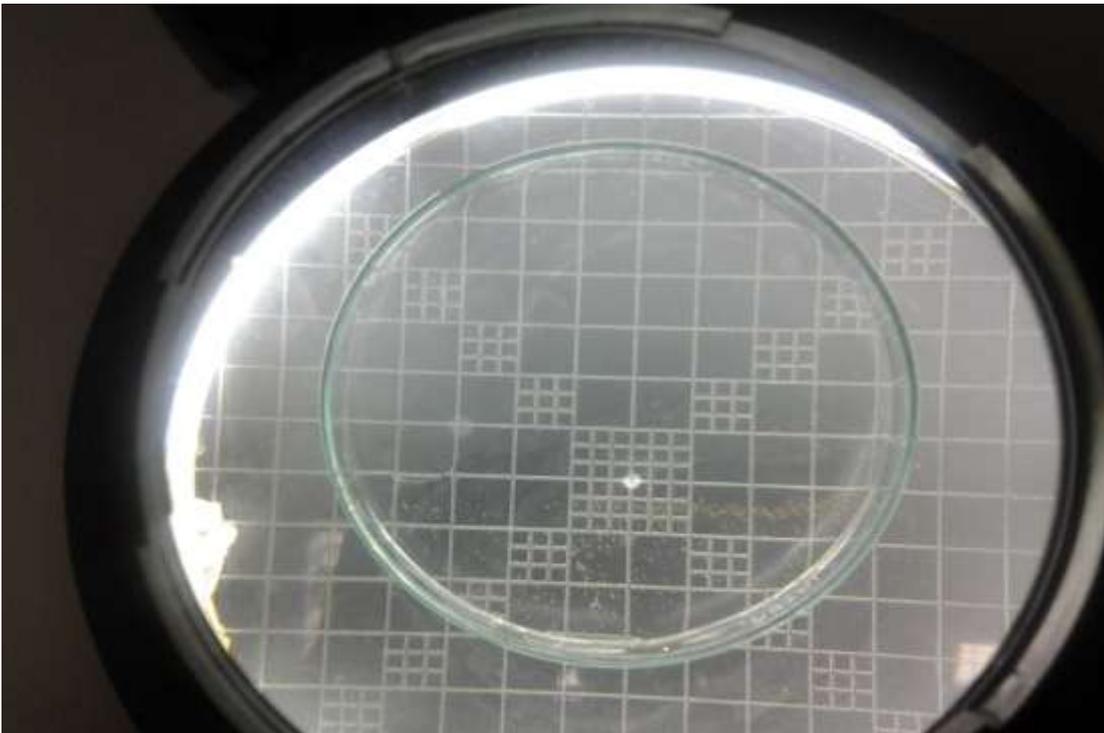
ANEXO N° 30.- Montado del dispositivo de incubación para la segunda reproducción de quistes de Artemia.



ANEXO N° 31.- En el matraz los nauplios de Artemia de la primera producción, en el eclosionador los quistes de Artemia para la segunda reproducción para su incubación.



ANEXO N° 32.- Artemias llevadas a una caja Petri, para una mejor visualización.



ANEXO N° 33.- Artemias en la caja Petri, para conteo y poder calcular el porcentaje de reproducción.



ANEXO N° 34.- Conteo de Artemias de la primera reproducción para el cálculo del % de reproducción.



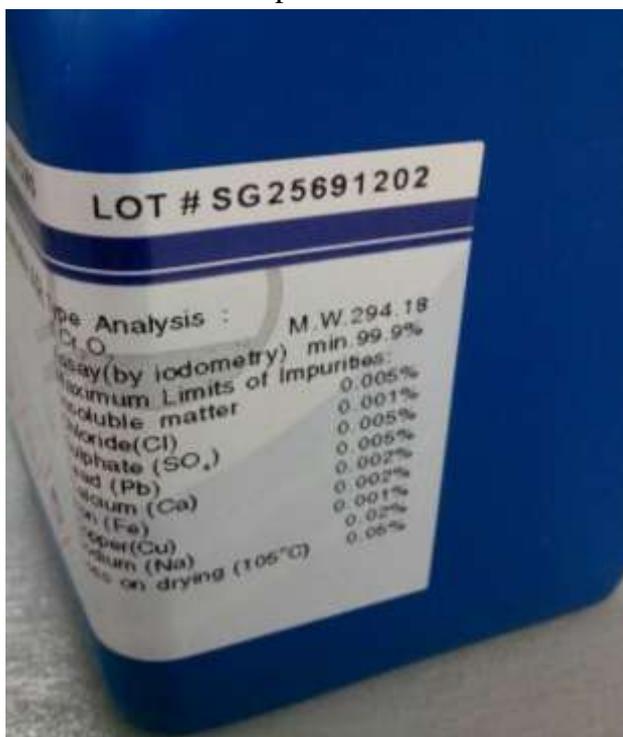
ANEXO N° 35.- Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$).



ANEXO N° 36.- Dicromato de Potasio en su estado natural.



ANEXO N° 37.- Especificaciones del Dicromato de Potasio.



ANEXO N° 38.- Agua destilada a utilizarse para la preparación de la solución madre de Dicromato de Potasio (solución 100 ppm).



ANEXO N° 39.- Preparación de la solución madre de Dicromato de Potasio (solución 100 ppm).



ANEXO N° 40.- Solución madre de Dicromato de Potasio (solución 100 ppm) ya preparada.



ANEXO N° 41.- Solución de 5 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de Potasio (solución 100 ppm).



ANEXO N° 42.- Solución de 10 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de Potasio (solución 100 ppm).



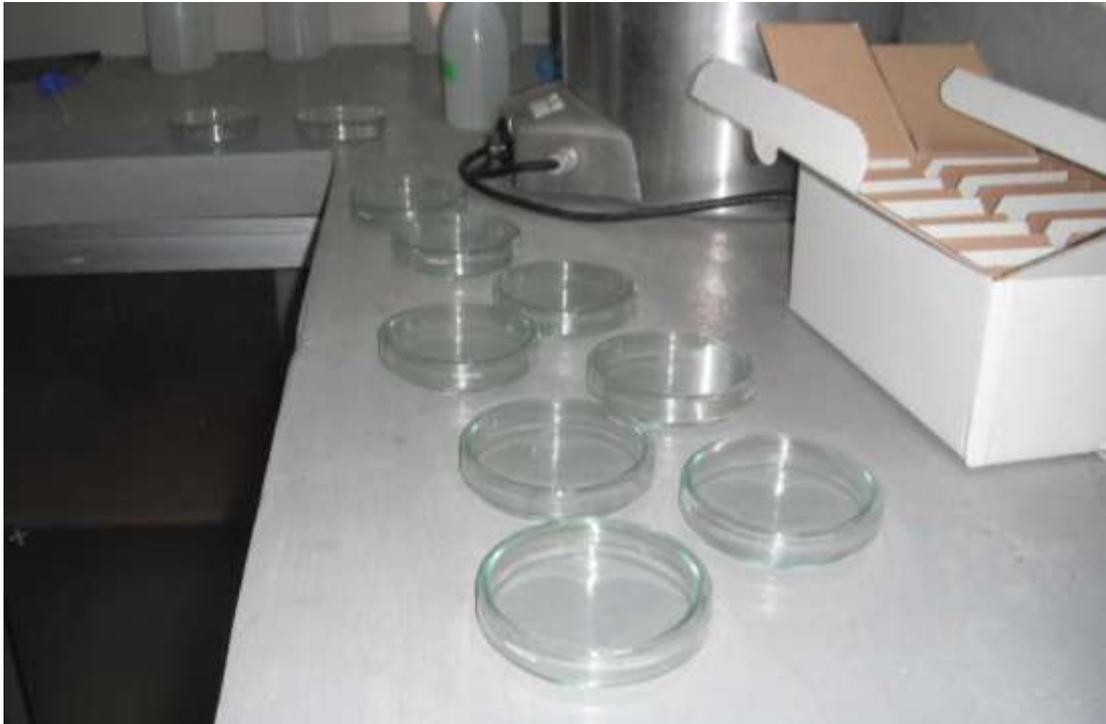
ANEXO N° 43.- Solución de 15 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de Potasio (solución 100 ppm).



ANEXO N° 44.- Solución de 20 ppm a partir de la solución madre de Dicromato de Potasio (solución 100 ppm).



ANEXO N° 45.- Cajas Petri nuevas que se utilizarían para el bioensayo.



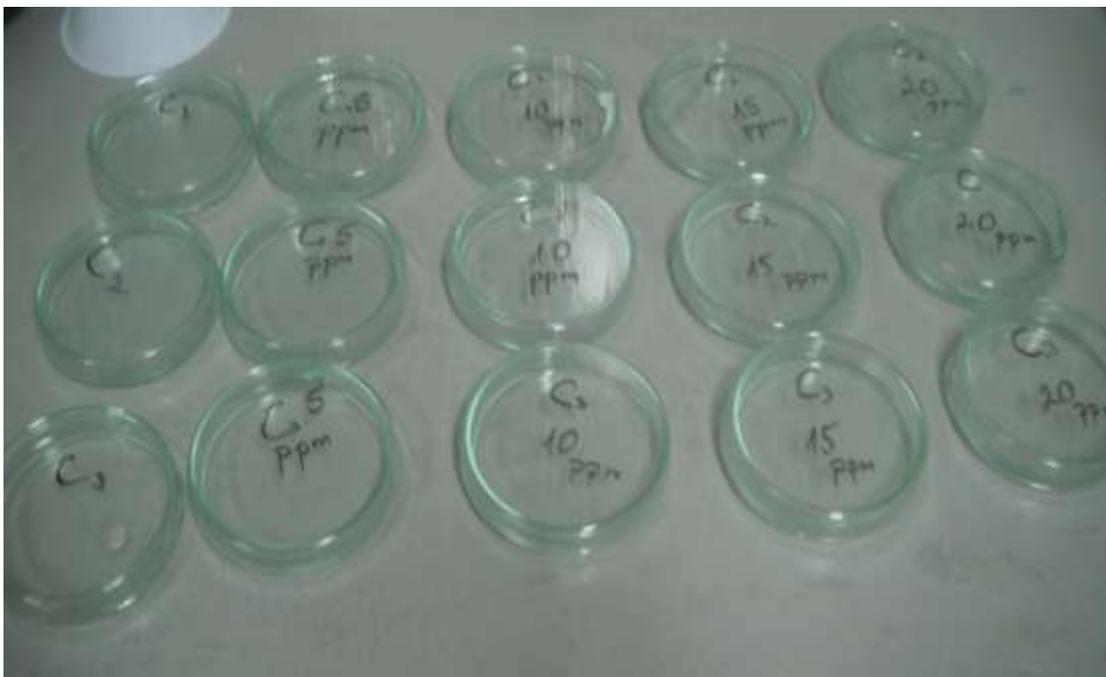
ANEXO N° 46.- Llenado de placas (grupo control,) 9 ml de agua con sal para cada caja Petri.



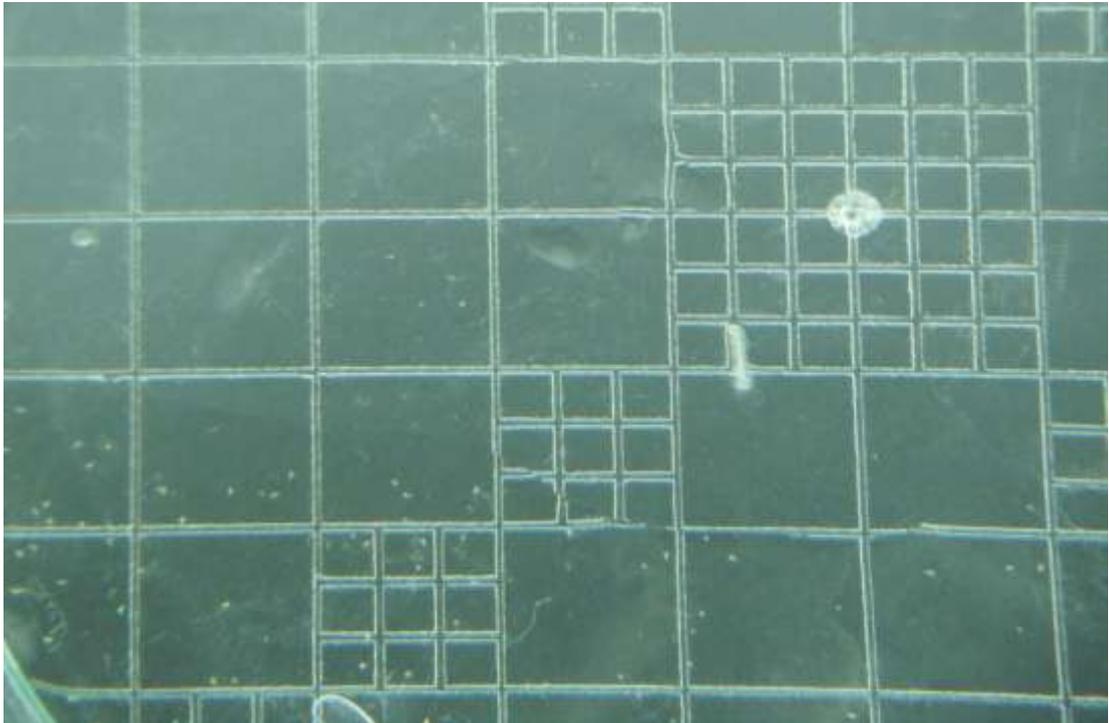
ANEXO N° 47.- Proceso de pipeteado para cada concentración de Dicromato de Potasio.



ANEXO N° 48.- Llenado de placas con sus respectivas concentraciones de Dicromato de Potasio (9ml de cada concentración en sus respectivas cajas Petri).



ANEXO N° 49.- 20 ml aprox. de nauplios de Artemias de la primera reproducción llevadas desde el eclosionador hasta una caja Petri sometidos a luz.



ANEXO N° 50.- Micropipeta Eppendorf .



ANEXO N° 51.- Micropipetas Eppendorf con las tapas a utilizarse en el bioensayo.



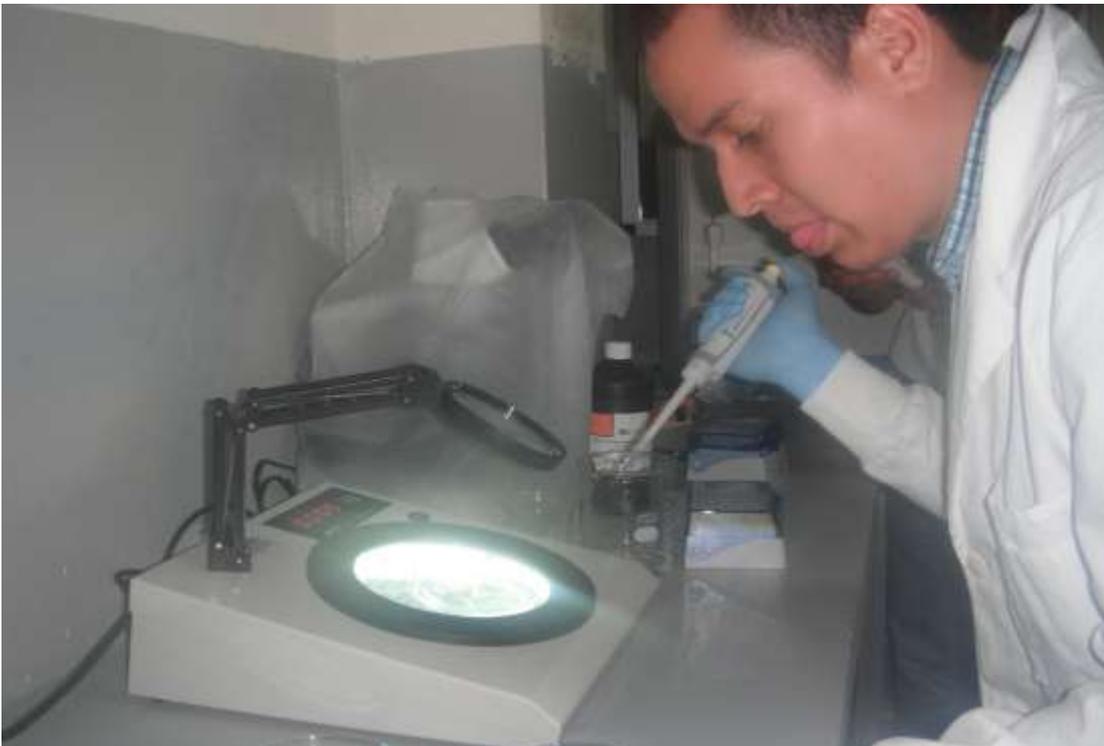
ANEXO N° 52.- Ensayo con las micropipetas Eppendorf.



ANEXO N° 53.- Artemias vivas llevadas a las cajas Petri (grupos controles) mediante micropipetas.



ANEXO N° 54.- Alcance de los 10 ml a las cajas Petri dependiendo de las pipeteadas.



ANEXO N° 55.- Grupos controles ya con las Artemias a sus diferentes concentraciones.



ANEXO N° 56.- Después de 24 horas, conteo de nauplios de Artemias que sobrevivieron a la concentración de 5 ppm.



ANEXO N° 57.- Conteo de nauplios de Artemias que sobrevivieron a la concentración de 15 ppm.



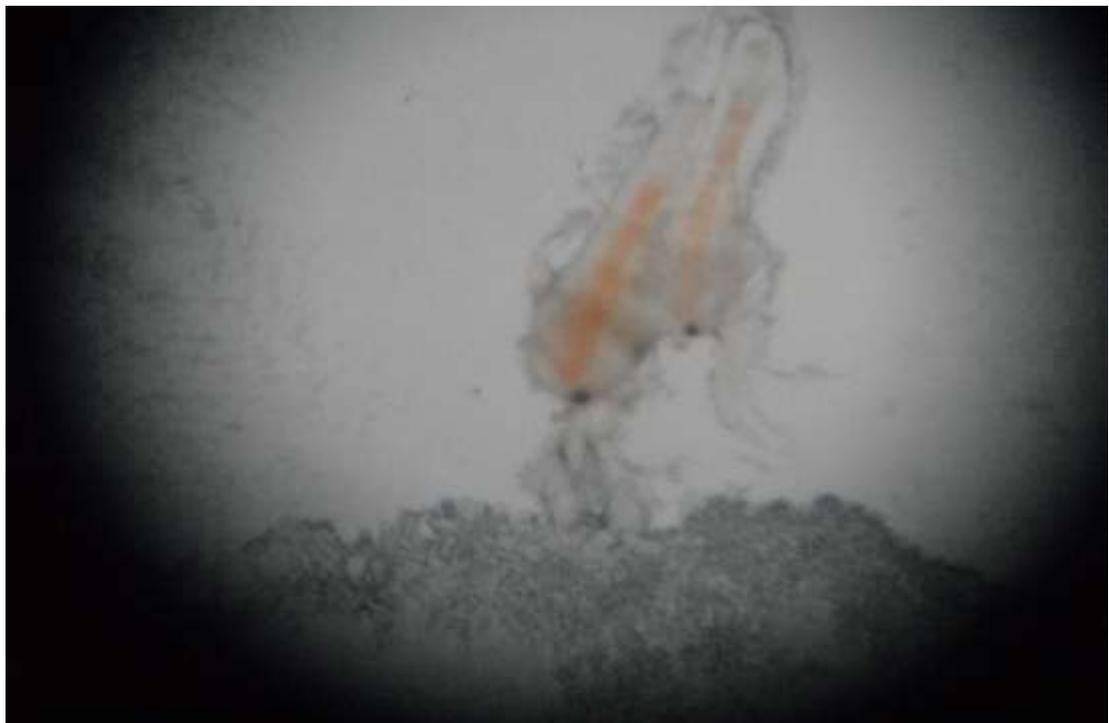
ANEXO N° 58.- Con la ayuda del microscopio se facilita observar el movimiento de las Artemias.



ANEXO N° 59.- Imágenes de Artemias captadas con el microscopio (sin exposición al Dicromato de Potasio).



ANEXO N° 60.- Artemias observadas desde el microscopio (expuestas al Dicromato de Potasio).



ANEXO N° 61.- Autores de la tesis junto al Director de la tesis.



ANEXO N° 62.- Autores de la tesis junto al Vicedecano de la carrera donando el autoclave para el laboratorio de ecotoxicología



ANEXO N° 63.- Autores de la tesis junto al Vicedecano de la carrera haciendo le entrega del microscopio digital para el laboratorio de ecotoxicología.



ANEXO N° 64.- Autores de la tesis junto al Vicedecano de la carrera haciendo le entrega de la estufa para el laboratorio de ecotoxicología



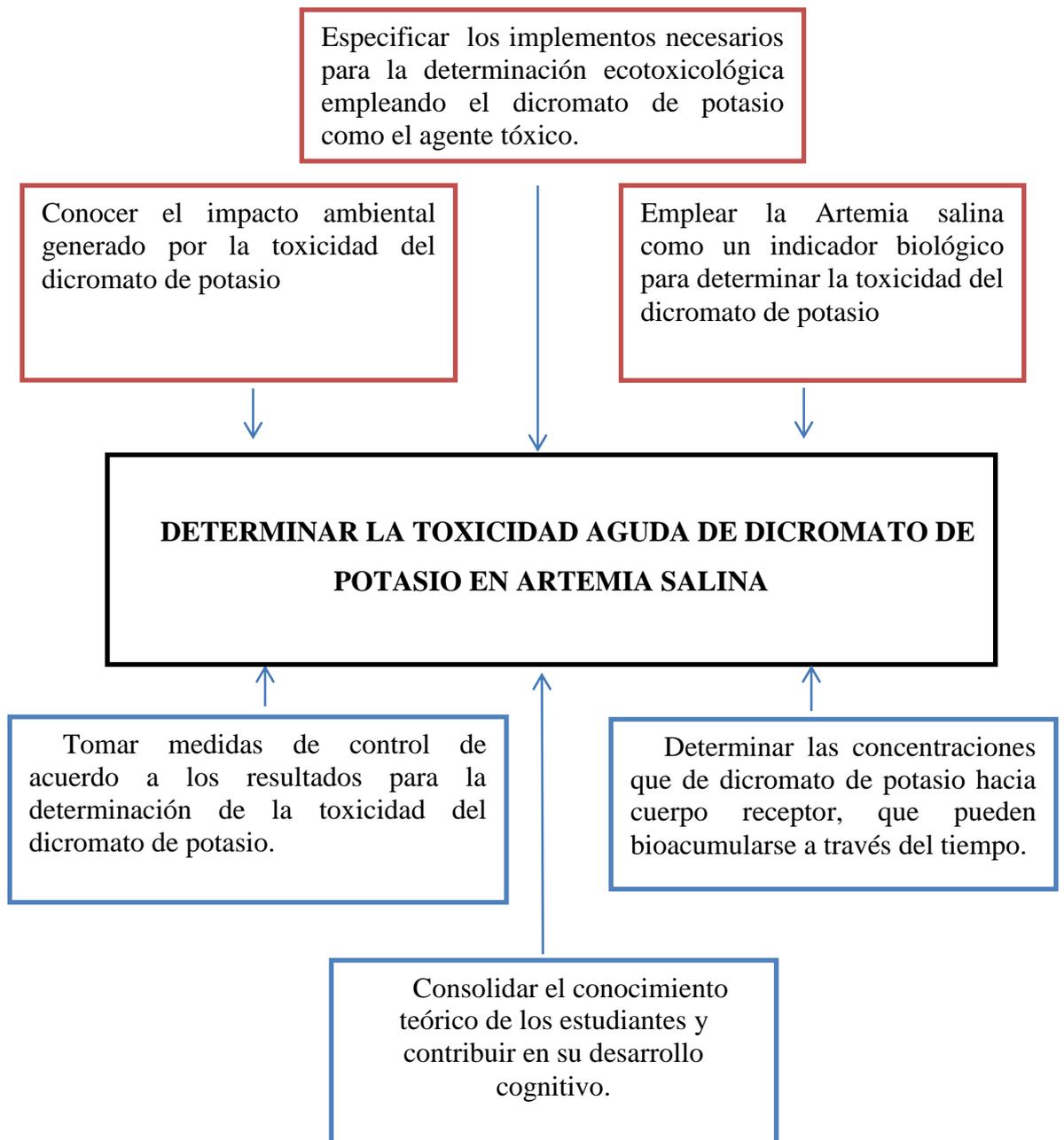
ANEXO N° 65.- Autores de la tesis junto al Vicedecano de la carrera haciendo le entrega de la cámara de flujo laminar para el laboratorio de ecotoxicología



ANEXO N° 66.- Matriz de los Involucrados.

GRUPOS E INSTITUCIONES	INTERESES	PROBLEMAS PERCIBIDOS	RECURSOS Y MANDATOS	INTERESES DEL PROYECTO	CONFLICTOS PARCIALES
<p>Autoridades de la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí.</p>	<p>Conocer el impacto ambiental provocado por La toxicidad del dicromato de potasio en los ecosistemas acuáticos.</p>	<p>Contaminación a los ecosistemas acuáticos por la acumulación y biomagnificación de compuestos tóxicos como el cromo hexavalente en formas de cromatos y dicromatos..</p>	<p>Apoyar en la determinación de un índice ecotoxicológico como lo es la concentración letal media de un toxico referente sobre un modelo biológico.</p>	<p>Obtener una concentración letal media sobre un modelo biológico determinado mediante ensayos en la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas de la Universidad Técnica de Manabí.</p>	<p>Falta de interés por parte de las Autoridades los y demás beneficiarios del proyecto.</p>
<p>Personal que labora en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Carrera de Ingeniería Química.</p>	<p>Tener conocimientos sobre ensayos ecotoxicológicos y su utilidad empleando sustancias patrones sobre modelos biológicos definidos.</p>	<p>Inexistencia del empleo de ensayos ecotoxicológicos como recurso para determinar la incidencia de tóxicos sobre seres presentes en el medio ambiente.</p>	<p>Emplear sustancias patrones, basándose en protocolos establecidos para determinar la dosis y concentración media.</p>	<p>Proporcionar al personal el procedimiento a seguir en cuanto a ensayos y valores de niveles no admisibles para el ambiente.</p>	<p>La falta de aplicación de técnicas modernas en el análisis toxicológico en proyectos</p>
<p>Estudiantes.</p>	<p>Adquirir conocimientos técnicos y científicos que *Complementar y afianzar los estudios de teoría.</p>	<p>Poca iniciativa en desarrollar conocimientos modernos.</p>	<p>Apoyo institucional.</p>	<p>Aplicar conocimientos para el mejoramiento técnicas el análisis toxicológico mediante bioindicadores</p>	<p>Que no se ejecute el proyecto.</p>

ANEXO N° 67.- Árbol del Problema.



ANEXO N° 68.- Árbol de Objetivos.

Implementar un banco de reactivos, sustancias patrones, equipos y accesorios necesarios para el manejo de los mismos en las evaluaciones ecotoxicológicas en el Laboratorio

Tabular los resultados obtenidos mediante la relación dosis – respuesta, empleando el sistema de análisis de varianza ANOVA.

Describir el potencial impacto de dicromatos (Cr_2O_7)⁻² y cromatos (CrO_7)⁻² al Ecosistema.

Exponer a diferentes concentraciones de Dicromato de Potasio a la Artemia Salina empleada como modelo biológico alternativo en ecotoxicología.

Determinar la concentración letal media (CL_{50}) del dicromato de potasio en Artemia Salina y los efectos adversos.

**DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA
DE DICROMATO DE POTASIO EN
ARTEMIA SALINA.**

Conocer la concentración letal media de dicromato de potasio que puede afectar a los organismos acuáticos mediante un indicador biológico.

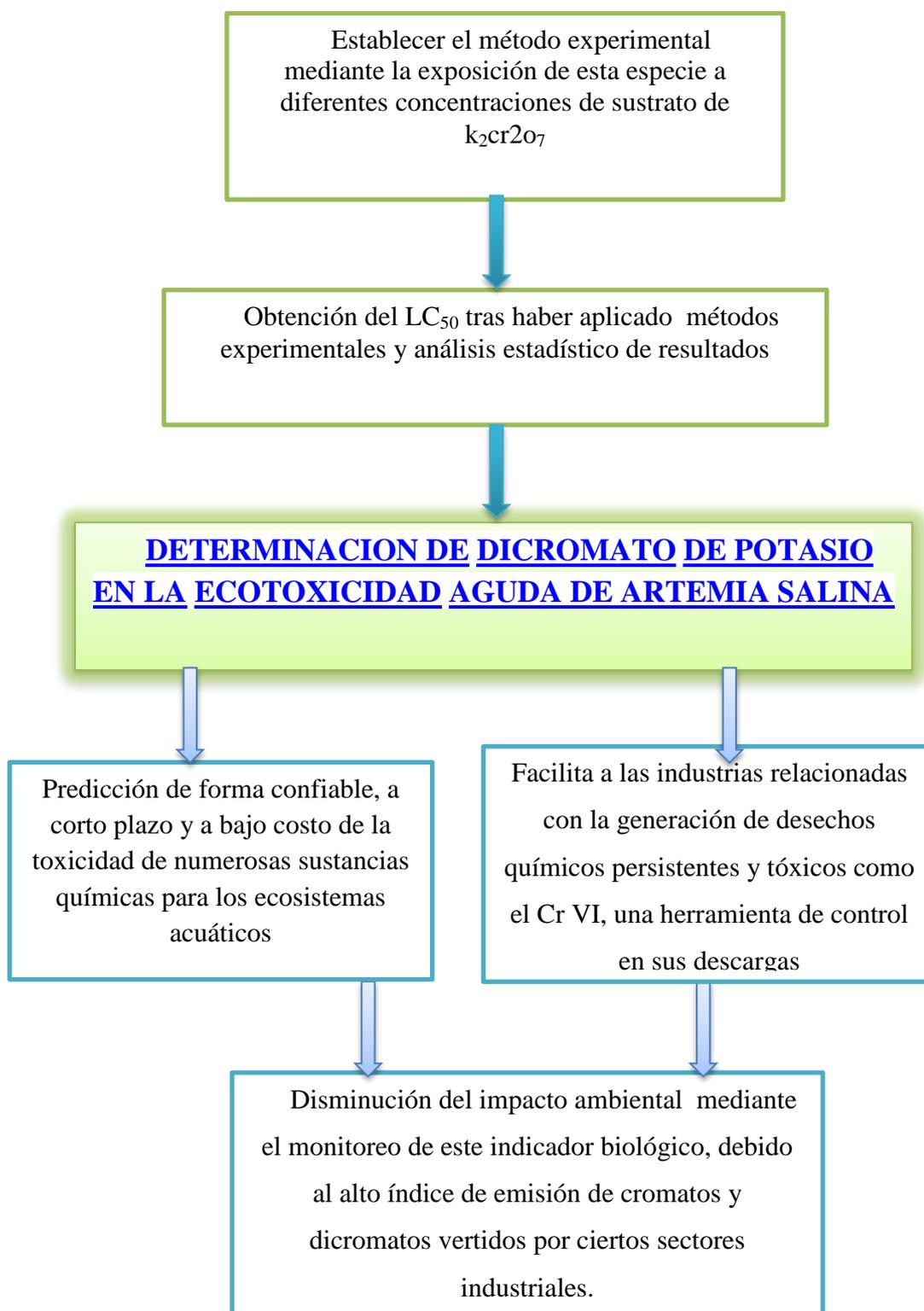
Observar el comportamiento del Bioindicador a diferentes concentraciones de dicromato de potasio.

Referenciar un modelo biológico sobre una sustancia patrón debido a su sensibilidad, para establecer existencia de toxicidad.

Evaluar los resultados estadísticamente y verificar la el nivel de concentración letal de dicromato el cual ocasiono efectos de mortalidad y subletales en la Artemia Salina.

Uso de tecnologías innovadoras y banco de reactivos para la ejecución de evaluaciones ecotoxicológicas

ANEXO N° 69.- Árbol de Alternativas.



ANEXO N° 70.- Matriz de Marco Lógico.

DETERMINACION DE DICROMATO DE POTASIO COMO PATRON EN ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICO SOBRELA ARTEMA SALINA						
Unidad Ejecutora	UNIVERSIDAD ECNICA DE MANABI/ FACULTAD DE MATEMATICAS FISICAS Y QUIMICAS					
Cobertura y Localización			Provincia de Manabí			
Plazo de Ejecución			6 meses			
Objetivo General	Objetivo Especifico	Actividades	Responsables	Tiempo	Indicador Gestión	Verificador
<ul style="list-style-type: none"> • Determinar la toxicidad aguda de Dicromato de Potasio en Artemia Salina 	<ul style="list-style-type: none"> • Describir el potencial impacto de dicromatos (Cr₂O₇)⁻² y cromatos (CrO₇)⁻² al Ecosistema. 	Recolección de material bibliográfico y útiles de oficina	Autores	6 meses	Marco teórico y protocolos establecidos.	Documento o copia de mismo
	<ul style="list-style-type: none"> • Exponer a diferentes concentraciones de Dicromato de Potasio a la Artemia Salina empleada como modelo biológico alternativo en ecotoxicología. 	Adquisición de implementos necesarios para el desarrollo experimental	Financiado por la UTM	6 meses	El físico de los implementos	TULAS, BMP EPA
	<ul style="list-style-type: none"> • Implementar un banco de reactivos, sustancias patrones, equipos y accesorios necesarios para el manejo de los mismos en las evaluaciones ecotoxicológicas en el Laboratorio. 	Análisis de laboratorio para la determinación de la toxicidad aguda de dicromato de potasio en Artemia salina	Autores	6 meses	Informe de resultados	Documento o copia de mismo
	<ul style="list-style-type: none"> • Determinar la concentración letal media (CL₅₀) del dicromato de potasio en Artemia Salina y los efectos adversos. • Tabular los resultados obtenidos mediante la relación dosis – respuesta, empelando el sistema de análisis de varianza ANOVA. 	Análisis estadísticos de los resultados por diversos métodos para determinar la CL ₅₀	Autores	6 meses	Informe de resultados estadísticos	EPA Documento

ANEXO N° 71.- Matriz de Monitoreo y Seguimiento.

ACTIVIDADES	INSUMOS		FECHAS DE EJECUCIÓN		MEDIO DE VERIFICACIÓN	RESULTADOS			
	Materiales	Humanos	Previsto	Límites		CUANTITATIVO Y CUALITATIVO			
						25%	50%	75%	100%
						R	B	MB	E
PRIMERA FASE DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN Obtener y desarrollar la información	*Cuaderno de apuntes. *Lapiceros.	*Autores de tesis *Director de tesis	01/11/13	31/01/14	*Cuadernos de apuntes *Computadora				X
SEGUNDA FASE Realizar los análisis ecotoxicológicos en la Artemia salina Ensayos en el laboratorio de Eco toxicología	*modelo biológico * Reactivos *Equipo de laboratorio	*Autores de tesis *Director de tesis * Laboratoristas	03/02/14	07/03/14	* experimentos *Análisis *Fotos				X
TERCERA FASE Establecer la toxicidad de la sustancia patrones en este caso dicromato de potasio. Según los resultados obtenidos en los ensayos y de acuerdo a los análisis estadísticos de los mismos, comparados a los que dicta la bibliografía.	*Cuaderno de apuntes *Resma de papel *Lapiceros *Computadora Impresora Copias	*Autores de tesis *Tutor	10/03/14	14/03/14	* Cuadernos de apuntes *Computadora * Análisis				X
CUARTA FASE ELABORACIÓN Preparar el documento final de Tesis Reunión con el tribunal de revisión Reunión con Director de Tesis Aprobación de Tesis Empastar Tesis Solicitar fecha de sustentación de Tesis Sustentar Tesis	*Resma de papel *Anillados *Computadora *Impresora *Skydrive		28/03/14	10/05/14	*Fotos *Facturas *trabajo Final				X