



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

USO DEL NEMATODO *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO MODELO
EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR GRADO DE TOXICIDAD EN
RELAVES MINEROS DEL CANTÓN PORTOVELO

DOMINGUEZ CEDEÑO RICARDO DAMIAN
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

POGO TOCTO CRISTOPHER RENE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

USO DEL NEMATODO *Caenorhabditis Elegans* COMO MODELO
EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR GRADO DE TOXICIDAD
EN RELAVES MINEROS DEL CANTÓN PORTOVELO

DOMINGUEZ CEDEÑO RICARDO DAMIAN
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

POGO TOCTO CRISTOPHER RENE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

USO DEL NEMATODO *Caenorhabditis Elegans* COMO MODELO EXPERIMENTAL
PARA DETERMINAR GRADO DE TOXICIDAD EN RELAVES MINEROS DEL
CANTÓN PORTOVELO

DOMINGUEZ CEDEÑO RICARDO DAMIAN
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

POGO TOCTO CRISTOPHER RENE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

GONZALEZ CARRASCO VICTOR HUGO

MACHALA, 11 DE FEBRERO DE 2019

MACHALA
2019

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado USO DEL NEMATODO *Caenorhabditis Elegans* COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR GRADO DE TOXICIDAD EN RELAVES MINEROS DEL CANTÓN PORTOVELO, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



GONZALEZ CARRASCO VICTOR HUGO

0702323809

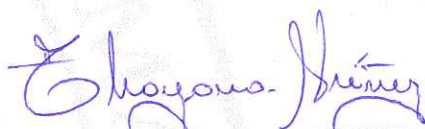
TUTOR - ESPECIALISTA 1



MORALES AUZ JAIME ROBERTO

0701132904

ESPECIALISTA 2



NUNEZ QUEZADA THAYANA

0702161068

ESPECIALISTA 3

Machala, 11 de febrero de 2019

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis RICARDO Actualizada 19de enero 2019 revisada con resumen.docx (D47016060)
Submitted: 1/20/2019 1:46:00 AM
Submitted By: cristofer777@gmail.com
Significance: 1 %

Sources included in the report:

<https://exportcvuy.anii.org.uy/CvEstatico/?urlId=543edc2cf59d3c4c965f2dd049c55f975561c7fe8d13a4fd3fbbd1266c4fa8407852e3002ab327bd7029732e9712926af30cfc12e95265ea6cbd4bf7a42c7975&formato=pdf&convocatoria=21>

Instances where selected sources appear:

1

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, DOMINGUEZ CEDEÑO RICARDO DAMIAN y POGO TOCTO CRISTOPHER RENE, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado USO DEL NEMATODO *Caenorhabditis Elegans* COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR GRADO DE TOXICIDAD EN RELAVES MINEROS DEL CANTÓN PORTOVELO, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 11 de febrero de 2019

DOMINGUEZ CEDEÑO RICARDO DAMIAN
1313440784

POGO TOCTO CRISTOPHER RENE
0707040697

DEDICATORIA

“Mi trabajo de titulación la dedico primero a Dios, ya que con su bendición pude culminar mi trayectoria estudiantil;

A mi familia que por medio de sus consejos me ha permitido superarme y mejorar, contribuyendo incondicionalmente a lograr las metas y objetivos propuestos para mi formación profesional”

- Ricardo Domínguez

DEDICATORIA

“Mi trabajo de titulación la dedico primero a Dios, ya que con su bendición pude culminar mi trayectoria estudiantil;

A mi madre que es mi pilar fundamental y siempre estuvo aconsejándome en todo momento, ella es mi motivación más grande para concluir con éxito mi carrera universitaria;

A mi familia que por medio de sus consejos me ha permitido superarme y mejorar, contribuyendo incondicionalmente a lograr las metas y objetivos propuestos para mi formación profesional”

-Christopher Pogo

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecirme todos los días y enseñarme lo extraordinario que es la vida, por permitirme nutrirme de conocimientos a lo largo de mi carrera universitaria, adquiriendo habilidades para mi formación profesional a futuro también agradezco a mis padres que con sabiduría han orientado mi vida a lo largo de mi carrera estudiantil, Agradezco a mi tutor Dr. Víctor Hugo González, quien nos orientó en todo el proceso de titulación, impartiendo sus conocimientos y experiencia profesional para culminar de manera satisfactoria la investigación.

A la Universidad Técnica de Machala por permitir ocupar sus equipos y laboratorios, que son herramientas indispensables para adquirir destrezas y habilidades como bioquímicos farmacéuticos.

-Ricardo Domínguez

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecirme todos los días y enseñarme lo extraordinario que es la vida, por permitirme nutrirme de conocimientos a lo largo de mi carrera universitaria, adquiriendo habilidades para mi formación profesional a futuro, también agradezco a mi madre, quien con sabiduría me ha orientado con buenos valores para ser una mejor persona, su apoyo fue incondicional en diferentes etapas de mi vida, siempre preocupada por mi bienestar.

A mi hermano, que estuvo pendiente por el avance de mi trabajo de investigación y por su ayuda cuando lo requería; a toda mi familia que me cuidaba por medio de sus oraciones para que todo salga bien y con éxito.

Agradezco a mi tutor Dr. Víctor Hugo González, quien nos orientó en todo el proceso de titulación, impartiendo sus conocimientos y experiencia profesional para culminar de manera satisfactoria la investigación.

A la Universidad Técnica de Machala por permitir ocupar sus equipos y laboratorios, que son herramientas indispensables para adquirir destrezas y habilidades como bioquímicos farmacéuticos.

-Christopher Pogo

RESUMEN

El cantón Portovelo ubicado en la provincia de El Oro es uno de los mayores referentes de minería en el Ecuador, esta actividad se ha realizado desde tiempos remotos para la obtención de metales preciosos y esto genera riesgos para el medio ambiente y la salud humana debido a los residuos generados por la extracción aurífera contienen trazas de contaminantes, los cuales son desechados en lugares cercanos a los ríos y al aire libre, en donde se pueden producir reacciones físicas y químicas, generando así compuestos aún más nocivos. Los niveles elevados de contaminantes en los desechos mineros es desconocida y en la actualidad no se ha realizado estudios que evidenciaran el grado de contaminación de los mismos. En la presente investigación se utiliza al nematodo *Caenorhabditis Elegans* como bioindicador del nivel de toxicidad en los relaves mineros ya que consta de características anatómicas y fisiológicas idóneas que pueden ayudar a evidenciar el nivel de contaminación y como afecta esto al ser humano. Para el estudio se tomaron 2 muestras en el sector El Pache y El Tablón donde se pudo apreciar un grado de contaminación elevada. Para el ensayo de mortalidad se utilizaron nematodos cultivados, estos fueron expuestos al extracto acuoso con diferentes concentraciones, se evaluó el parámetro de mortalidad en un periodo de lecturas de 12, 24, 36 y 48 h para determinar el CL₅₀. En base a los resultados, podemos concluir que existe la presencia de metales pesados (Hg, Cd, As, Sb), con cantidades extremadamente elevadas de mercurio y arsénico en las estaciones estudiadas, suscitando un grave peligro para la población.

Palabras claves: Relaves mineros, bioensayos, *Caenorhabditis Elegans*, bioindicador, metales pesados.

ABSTRACT

The Portovelo canton located in the province of El Oro is one of the largest references of mining in Ecuador, this activity has been carried out since ancient times to obtain precious metals and this generates risks for the environment and human health due to The waste generated by the gold extraction contains traces of pollutants, which are discarded in places close to the rivers and in the open air, where physical and chemical reactions can be produced, thus generating even more harmful compounds. The high levels of contaminants in the mining waste is unknown and at present no studies have been carried out to show the degree of contamination of the same. In the present investigation, the nematode *Caenorhabditis Elegans* is used as a bioindicator of the level of toxicity in mine tailings since it consists of suitable anatomical and physiological characteristics that can help to show the level of contamination and how this affects the human being. For the study, 2 samples were taken in El Pache and El Tablón sector, where a high level of contamination could be observed. For the mortality test, cultured nematodes were used, these were exposed to the aqueous extract with different concentrations, the mortality parameter was evaluated in a reading period of 12, 24, 36 and 48 h to determine the LC50. Based on the results, we can conclude that there is the presence of heavy metals (Hg, Cd, As, Sb), with extremely high amounts of mercury and arsenic in the stations studied, causing a serious danger to the population.

Keywords: Mine tailings, bioassays, *Caenorhabditis Elegans*, bioindicator, heavy metals.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO I.....	16
1.1 Planteamiento del Problema.....	16
1.1.1 Problema General.....	16
1.1.2 Problemas Específicos.....	16
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo General.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	17
1.3 Hipótesis.....	17
1.4 Justificación	18
CAPÍTULO II	19
2. Marco teórico	19
2.1 Área de estudio - Cantón Portovelo	19
2.2 Reseña histórica de la minería en Ecuador y el cantón Portovelo.....	19
2.1.1 Ubicación sectorial y física de la Investigación	20
2.1.2 Mapas del lugar de investigación.....	20
2.3 Explotación Minera.....	20
2.4 Ley de Minería en Ecuador.....	21
2.5 Relaves mineros.....	22
2.5 Metales Pesados.....	22
2.6.4 Antimonio	26
2.7 Caenorhabditis elegans como modelo experimental.....	27
CAPÍTULO III.....	29
3. Metodología	29
3.1 Tipo de Diseño de Investigación.....	29
3.2 Materiales, equipos y reactivos	29
3.3 Técnicas y métodos.....	31
CAPÍTULO IV.....	36
4.1 Resultados y Discusión	36
CAPÍTULO V	45
CONCLUSIONES	45
CAPÍTULO VI.....	46
RECOMENDACIONES	46

BIBLIOGRAFÍA	47
.....	53
EVIDENCIA FOTOGRÁFICA	54

CONTENIDO DE CUADROS, ILUSTRACIÓN Y MAPAS

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Mortalidad CL 50 del Caenorhabditis Elegans en extracto acuoso en muestra de relaves minero del sector el Pache. Fuente: Realizado por Ricardo Domínguez y Christopher Pogo.....</i>	<i>36</i>
<i>Cuadro 2. Mortalidad CL 50 del Caenorhabditis Elegans en extracto acuoso en muestra de relaves minero, vertedero de desechos mineros “El Tablón”. Fuente: Realizado por Damián Domínguez y Christopher Pogo.</i>	<i>37</i>
<i>Cuadro 3. Lugar, temperatura y concentración de metales pesados expresados en ppm y ppb. Fuente: Realizado por Damián Domínguez y Christopher Pogo</i>	<i>39</i>
<i>Cuadro 4 Valores de LC₅₀ para las muestras analizadas con sus respectivos límites de confianza obtenidos a partir de Predicciones Inversas para Concentración con las ecuaciones de regresión de los análisis Probit.</i>	<i>41</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grafica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (36h) de <i>C. Elegans</i> y concentración del extracto de relave minero de la Estación El Pache.....	39
Figura 2. Grafica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (48h) de <i>C. elegans</i> y concentración del extracto de relave minero de la Estación El Pache.	40
Figura 3. Relación entre mortalidad (36h) de <i>C. elegans</i> y dosis de los extractos de relave minero Estación El Pache. Dentro del cuadro se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.....	40
Figura 4. Relación entre mortalidad (48h) de <i>C. elegans</i> y dosis de los extractos de relave minero Estación El Pache. Dentro del cuadro se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.....	41
Figura 5. Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (36h) de <i>C. elegans</i> y concentración de relave de la Estación El Tablón.	42
Figura 6. Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (48h) de <i>C. elegans</i> y concentración de relave de la Estación El Tablón.	42
Figura 7. Relación entre mortalidad (36h) de <i>C. elegans</i> y dosis de los extractos de relave minero Estación El Tablón Dentro de la gráfica se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.....	43
Figura 8. Relación entre mortalidad (48h) de <i>C. elegans</i> y dosis de los extractos de relave minero Estación El Tablón Dentro de la gráfica se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.....	43
Figura 9. Normas de calidad del suelo expresado en mg/kg.....	53

ÍNDICE DE ILUSTRACIÓN

<i>Ilustración 1. Preparación de agar K</i>	54
<i>Ilustración 2. Preparación de medios de cultivo</i>	54
<i>Ilustración 3. Esterilización de materiales</i>	54
<i>Ilustración 4 Llenado de cajas Petri</i>	54
<i>Ilustración 5. Agar para estudios</i>	55
<i>Ilustración 6. Recolección de muestra</i>	55
<i>Ilustración 7. Tamizaje luego del triturado</i>	55
<i>Ilustración 8. Maceración por 24 horas</i>	55
<i>Ilustración 9. Materiales necesarios para el extracto acuoso</i>	56
<i>Ilustración 10. Ensayo de mortalidad</i>	56

ÍNDICE DE MAPAS

<i>Mapa 1. Provincia de El Oro, se genera la mayor actividad minera en el Ecuador. Fuente: www.google.com, Google Eart.</i>	20
---	----

INTRODUCCIÓN

La actividad minera en Ecuador es realizada a gran escala y también de forma artesanal, sobre todo en gran parte de la zona sur del país dedicada a la extracción de oro y otros metales, generando efectos negativos sobre suelos agrícolas y tierra habitable en los cantones Zaruma y Portovelo¹. La causa principal es el tratamiento inadecuado de la gran cantidad de desechos contaminados, también denominados relaves, provenientes de las operaciones mineras que se realizan sin observar medidas ambientales acertadas, porque no concluyen con el cierre del proceso y la debida restauración de las áreas afectadas². En este sentido, se requiere despertar la responsabilidad disminuir la creación de pasivos ambientales por parte de las plantas de beneficio, ya que son las encargadas de procesar el material rocoso para la obtención del oro y generar desechos finales, es decir “lodos”, que están constituidos por una mezcla de tierra, agua, minerales y altas concentraciones de elementos químicos tóxicos empleados para las extracciones auríferas³.

Dado la notable contaminación es importante determinar el nivel de riesgo ambiental presente en los relaves mineros con el uso de bioindicadores entre los cuales destaca el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que por sus características a nivel genético, molecular, fisiológico y de desarrollo, es elegido para pruebas de toxicidad⁴ además de poseer otras características como un corto ciclo de vida, facilidad de reproducirlo en masa y con bajos costos de mantenimiento en el laboratorio lo que permite obtener resultados a corto plazo⁴.

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un bioindicador empleado para analizar la toxicidad de diferentes xenobióticos con base en parámetros de punto final como mortalidad en ensayos toxicológicos⁵. En este orden de ideas, el objetivo de esta investigación es determinar la factibilidad de emplear por primera vez al nematodo *Caenorhabditis elegans* como bioindicador para establecer la toxicidad en los relaves producto de la actividad minera (extracción de oro), específicamente en el cantón Portovelo localizado en la Provincia de El Oro, en Ecuador.

CAPÍTULO I

1.1 Planteamiento del Problema

1.1.1 Problema General.

- ¿Es posible obtener una respuesta en estudios toxicológicos con el nematodo *Caenorhabditis Elegans*?

1.1.2 Problemas Específicos.

- ¿Los relaves mineros poseen niveles de metales pesados en concentraciones que revistan un riesgo de contaminación importante?
- ¿Se verá afectado el nematodo *Caenorhabditis Elegans* al ser expuesto a los extractos acuosos de relaves mineros? De ser así, ¿Cuál es la concentración letal media CL₅₀ en *Caenorhabditis Elegans* de los extractos de los relaves mineros?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General.

- Evaluar la toxicidad de los relaves mineros producidos en el cantón Portovelo, utilizando como bioindicador el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

1.2.2 Objetivos Específicos.

- Determinar la concentración letal media (Cl₅₀) de extractos de los relaves mineros en *Caenorhabditis elegans* mediante bioensayos de toxicidad *in vitro*
- Cuantificar la concentración de metales pesados en relaves mineros en dos estaciones del cantón Portovelo.
- Determinar cuál de las estaciones estudiadas presenta el mayor grado de contaminación.

1.3 Hipótesis

La presencia de metales pesados en relaves mineros producidos por la actividad de extracción de oro en el Cantón Portovelo representa un problema ambiental por la toxicidad de esos elementos; por lo tanto, la exposición del nematodo *Caenorhabditis elegans* a extractos acuosos de esos relaves permitirá establecer a través del porcentaje de mortalidad, la concentración letal media de esos extractos.

1.4 Justificación

Ecuador posee una trayectoria histórica vinculada a la minería del oro que se desarrolla en 3 cantones en la zona sur del país, entre las que se ubica Portovelo, zona elegida para realizar esta investigación y en la que actualmente la minería es su principal fuente de trabajo⁶. El oro se ha convertido en el cuarto producto de exportación en el año 2012, además de superar en crecimiento a industrias de extracción como el petróleo crudo y gas natural.

Durante el proceso se utilizan métodos para la obtención del elemento, mayormente empleando técnicas de amalgamado^{7,8}. Esta práctica tiene riesgos medioambientales debido a la contaminación por mercurio, además de generar grandes cantidades de desechos finales, también denominados relaves y que normalmente están constituidos por una mezcla de metales pesados empleados para la recuperación del oro, que por su toxicidad representan un gran riesgo para la salud humana, y que incluyen mercurio, antimonio, cadmio y arsénico⁹.

El estado ecuatoriano es el encargado de gestionar estos recursos naturales, velando por el cumplimiento laboral y ambiental conforme a las leyes de país¹⁰. Sin embargo, parte de las zonas de extracciones auríferas están contaminadas por la explotación en las minas al aire libre, muchas veces con poco control, causando molestias a los pobladores que en algunos de los casos se han visto forzados a abandonar sus territorios. Debido a que no existen datos oficiales sobre el nivel de contaminación en el cantón Portovelo a consecuencia de las relaveras, este proyecto tiene como objetivo aportar la evaluación de la toxicidad de los relaves mineros producidos en el cantón Portovelo, utilizando como bioindicador el nematodo *Caenorhabditis elegans*¹⁰

CAPÍTULO II

2. Marco teórico

2.1 Área de estudio - Cantón Portovelo

La parte sur de la provincia de El Oro es una rica zona minera, conectando con la Cordillera Sur de los Andes ecuatorianos y la cordillera de Vizcaya donde atraviesa el Río Amarillo. Situada al sur de El Oro, aproximadamente a 105 Km de Machala tiene un área extensa de 35 Km². La altitud promedio es entre los 600-3000 msnm. Posee una temperatura de 18-28 °C y temperatura media de 22°C, presentando una humedad total de 78%, los datos expuestos pertenecen al Ministerio de Turismo del Ecuador¹¹.

La trayectoria histórica de explotación de las minas empieza desde los años 1560 en territorios que en la actualidad constituyen los cantones de Portovelo y de Zaruma, siendo uno de los principales centros mineros para el sector, donde la población disminuye o crece dependiendo de la evolución de las explotaciones auríferas¹².

2.2 Reseña histórica de la minería en Ecuador y el cantón Portovelo.

Según la historia, los últimos años del siglo XIX y los primeros del XX pueden ser tomados en cuenta como la partida de nacimiento de la minería a gran escala en Ecuador. Portovelo se remonta como asiento minero en los años de 1549 cuando los españoles llegaron a la explotación de las minas, dicho lugar estuvo poblado por aborígenes enfocados a las extracciones auríferas en el río Amarillo y que al sector fue nombrado Pampa de Oro o Curipamba¹³.

La empresa transnacional de origen norteamericano llamada SADCO, abandonó las instalaciones y operaciones por presiones políticas. No obstante la empresa no cerró y se crea la compañía CIMA (Compañía Industrial Minera Asociada), contando con capital local, y forma parte de la minería SADCO durante la década de los 70¹³.

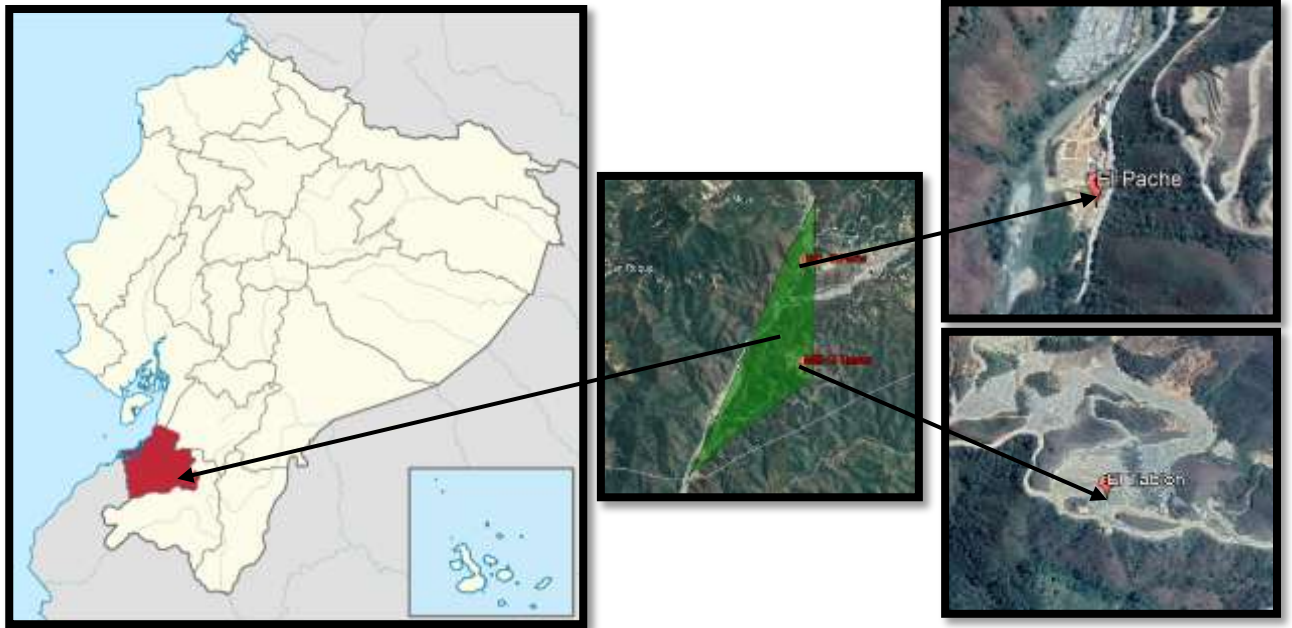
Al disminuir las actividades de la empresa CIMA, cobra auge la minería artesanal siendo la principal actividad económica de Portovelo y posicionarse el primer cantón minero del país¹³.

2.1.1 Ubicación sectorial y física de la Investigación

País: Ecuador, Provincia: El Oro, cantón: Portovelo, sector: El Pache, El Tablón

2.1.2 Mapas del lugar de investigación

Mapa 1. Provincia de El Oro, se genera la mayor actividad minera en el Ecuador.



Fuente: www.google.com, Google Earth.

2.3 Explotación Minera.

El proceso minero contribuye a la fuente de trabajo directo e indirecto, pero por técnicas de extracción irresponsables provoca la contaminación de suelos y ríos, creando territorios estériles para el cultivo de plantas generando inconformidad para el sector agrícola y deslizamientos que llegarían a afectar a las áreas urbanas, por falta de control por parte de las autoridades^{14,15}.

La explotación minera es organizada por trabajadores artesanales, provocando invasiones de terreno, empleos ilegales y tratamiento inadecuado de residuos, siendo un foco de contaminación⁶. Es un proceso complejo que ha causado la contaminación de los suelos, el

agua y el aire, generando riesgos para la salud de las personas que viven cerca del sector industrial de la minería^{6,16}.

La actividad minera es una fuente importante de ingresos en la actividad económica¹⁷. La remoción de materiales conlleva al uso de maquinaria que generan grandes cantidades de residuos mineros elevando el riesgo de contaminación ambiental y las consecuencias que eso tiene para la sociedad¹⁸.

2.4 Ley de Minería en Ecuador.

El medio ambiente y los derechos laborales en la actualidad son protegidos por la Constitución del Ecuador mediante La Ley de Remediación Ambiental y tratados internacionales, todas estas normativas evitan que sean violentados los derechos de todos los seres humanos y la naturaleza, derechos que han sido vulnerados desde el año de 1970 debido a que se viene realizando minería a gran escala y con un control ambiental reducido¹⁹.

Toda la contaminación se da por falta de la aplicación de las normativas establecidas y por las bajas multas o sanciones que se establecen para aquellas personas que se dedican a la minería y la contaminación indiscriminada sobre la naturaleza y los pobladores, en especial la contaminación de los ríos Pache y Amarillo que con contaminados indiscriminadamente por la industria minera que arroja gran cantidad de desechos a sus afluentes¹⁹.

Las plantas mineras obtienen muchas ganancias al desechar los residuos de los agentes contaminantes a las orillas del río, puesto que, estas no incorporan normas de seguridad y de precaución para mantenerse de forma segura todos estos componentes perjudiciales para la salud de los pobladores¹⁹.

Los gobiernos de Ecuador ante la minería artesanal descuidan el impacto de toxicidad frente a metales pesados. En Bella Rica ubicada en la provincia Azuay, parte alta de El Oro y Zamora Chinchipe, la minería está asociada a la pobreza, convirtiéndose en una práctica rutinaria para la supervivencia y cubrir necesidades indispensables para su familia²⁰.

Zaruma y Portovelo presentan los índices de minería artesanal altas, provocando un cambio en la biodiversidad, incluyendo los metales pesados en diferentes organismos y

contaminación por mercurio en los ríos Puyango, Gala, Chico y Siete, además de la pérdida de agua potable, generando problemas de salud a los pobladores¹.

2.5 Relaves mineros.

La extracción de los minerales conlleva a desechos denominados relaves mineros, que consiste en un conjunto de minerales, tierra, agua, rocas y sustancias químicas y tóxicas³. El proceso de molienda, purificación, lixiviación incluyendo procesos químicos y físicos se convierte en grandes residuos mineros que en muchos de los casos son depositados sin control ambiental, creando pasivos ambientales³.

La minería por sí misma afecta áreas pequeñas, pero esto va a tener un gran impacto sobre el ambiente, debido a la liberación de metales pesados, esto ocurre principalmente, por la filtración o drenaje ácido de mina y erosión y depósitos de relaves. Los niveles de metales pesados van a depender de la naturaleza de los desechos de los depósitos de relaves²¹.

En la zona sur del Ecuador a lo largo del tiempo se han depositado exorbitantes volúmenes de residuos tóxicos producto de la extracción de minerales por pequeños mineros artesanos. Parte de la gran mayoría son depositados sin ninguna supervisión de una entidad reguladora de gestión ambiental, provocando la contaminación del ecosistema².

El origen de estos pasivos ambientales se debe a las actividades mineras-metalúrgicas que se llevan a cabo sin una normativa ambiental que regule estas operaciones²¹.

2.5 Metales Pesados.

Los metales pesados se encuentran de forma natural en el medio ambiente y además en concentraciones que por lo general no son perjudiciales para la biota. No obstante, los metales pesados no pueden ser destruidos o degradados, pero si pueden ser disueltos por agentes químicos y físicos y ser lixiviados, algunos de estos metales pesados pueden formar complejos solubles y ser distribuidos a los diferentes ecosistemas hasta llegar al suelo, agua, plantas, semillas^{22,23,24}.

La Agencia Estadounidense para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades, cataloga los riesgos de los desechos tóxicos de acuerdo a la gravedad de la contaminación y

su prevalencia como sustancias peligrosas para la salud, entre los que lideran la tabla es el mercurio, cadmio, arsénico y antimonio, siendo de un gran interés toxicológico^{25,26,27}.

2.5.1 Mercurio.

El mercurio, normalmente conocido como azogue es un metal que se representa en la tabla periódica como Hg, corresponde a los metales de transición y tiene su número atómico es 80, es el único metal en estado de segregación a temperatura ambiente es líquido, además no puede mojar superficies con las que entra en contacto esto debido a su tensión superficial y es muy buen conductor de electricidad²⁸.

El mercurio junto a otros metales como el oro, plata, plomo y hierro eran conocidos desde la antigüedad y usados por las primeras grandes civilizaciones, es uno de los metales con más amplia distribución en el ambiente y además conocido por su elevado grado de toxicidad como el compuesto metilmercurio y es uno de los responsables de contaminaciones a gran escala, en los últimos años ha aumentado su concentración en el ambiente y es bioquímicamente activo y bioacumulable, a esto se debe su alta toxicidad tanto para seres vivos y el ambiente^{28,29}.

2.5.1.2 Fuentes de mercurio.

Como contaminante el mercurio proviene de diferentes fuentes, tanto naturales como antropogénicas: De forma natural puede ser liberado por movilizaciones de la corteza terrestre, actividad volcánica y por erosión de rocas. De forma antropogénica, están asociadas las industrias mineras, producción de cemento y el uso de combustibles fósiles. El mercurio en forma metálica se ha utilizado desde la antigüedad para la extracción de oro y plata, en interruptores eléctrico, termómetros^{28,30}.

2.5.1.3 Vías de exposición

Ingesta, inhalación y absorción, estas son las tres vías por las cuales el mercurio puede ingresar al cuerpo humano²⁸, puede ingresar el mercurio mediante alimentos contaminados, amalgamas dentales, exposición a pinturas que contengan mercurio, trabajos en actividad minera y otros factores notables, pero los efectos adversos sobre la salud van a depender del tiempo y al nivel de exposición que tenga cada persona con el mercurio^{28,31}.

En la investigación titulada “Contaminación por Mercurio en Zaruma y Portovelo” realizada por Yépez Villamil, Barreno Yunda, manifiestan que las poblaciones de Zaruma,

Portovelo y sectores rurales aledaños, existe un aumento significativo de los niveles de mercurio en sangre³².

Los procesos mineros empleados actualmente en dicho cantón no son amigables con el ambiente lo aclara Yépez Villamil, Barreno Yunda en su investigación realizada, concerniente a malas prácticas de extracción de minerales, el nivel de mercurio en sangre de los pobladores aumenta en un 88%³².

2.5.1.4 Manifestaciones clínicas del Mercurio

El mercurio es dañino para el medio ambiente y la salud humana, tiene la capacidad de bioacumularse²⁸. La intoxicación crónica por mercurio se pueden presentar temblores, hipertrofia de tiroides, gingivitis, cambios en la personalidad, pérdida de memoria, además hay daño renal por exposición crónica de mercurio, la neurotoxicidad se manifiesta con temblores y pérdida de sensibilidad en dedos de las extremidades, pérdida de audición y visión, espasmos y finalmente la muerte^{22,33}.

2.6.2 Cadmio

Junto al mercurio y zinc el cadmio es un elemento químico perteneciente al grupo 12 de la tabla periódica, es un metal que en estado puro es blando, maleable y de color plateado claro, el cadmio es un metal pesado que se encuentra dentro de los más tóxicos y está ampliamente distribuido en la corteza terrestre³⁴.

Es un metaloide que puede presentarse en tres estados alotrópicos: gris, negro y amarillo. El arsénico amarillo es una forma cristalina metaestable que se oxida a temperatura ambiente por la acción del aire y revierte al estado gris por la acción de la luz. El arsénico no es insoluble agua, pero sí en los ácidos fuertes. Los minerales más corrientes de arsénico en la naturaleza son los sulfuros³⁵.

2.6.2.1 Toxicocinética del cadmio

La vida media del Cd^{2+} dentro del cuerpo humano se aproxima a los 15 a 30 años, El cadmio debido a la absorción a nivel de estómago o intestino entra al torrente sanguínea por ingerir agua o alimentos contaminados, una vez absorbido el cadmio es transportado al hígado donde este va a inducir la síntesis de proteínas de peso molecular bajo ricas en azufre y las principales vías de excreción del cadmio son orina y heces^{35,36}.

2.6.2.2 Vías de exposición

La población a través de la contaminación del aire, agua, suelos, alimentos y el tabaco entra en contacto con el cadmio, siendo la principal fuente de exposición la dieta para los no fumadores. La deposición atmosférica del cadmio, actividades minera y aplicación de fertilizantes conllevan a la contaminación de los suelos y conlleva a la absorción por los cultivos y posterior consumo humano³⁴.

2.6.2.3 Manifestaciones Clínicas del Cadmio

Las manifestaciones pueden clasificarse como agudas y crónicas, todo esto va a depender del tiempo y modo de dicha exposición, la contaminación por cadmio en alimentos suele ser crónica, la inhalación de cadmio puede presentar un cuadro asintomático distinguible como es fiebre, dolor torácico, disnea y edema agudo del pulmón. Los síntomas causados por ingestión de cadmio pueden ser: náuseas, vómitos, cefalea y dolores abdominales³⁷.

2.6.3 Arsénico

El arsénico (As) es uno de los metaloides más tóxicos que podemos encontrar en el medio ambiente, ocupa el puesto 20 en abundancia de los elementos presentes en la corteza terrestre y su distribución no es uniforme en el mundo, todo esto va a depender de la región geográfica, características geoquímicas del suelo y actividad industrial³⁸. El arsénico se puede encontrar en la atmósfera, suelo, cuerpos de agua, minerales, rocas, organismos de formas inorgánicas y orgánicas³⁸, las concentraciones de arsénico presente en suelos no contaminados son menores a los 20mg/kg de suelo^{39,40}.

Usualmente al arsénico se lo encuentra principalmente como arsenito y arseniato en el ambiente³⁹; el arsenito es 70 veces más tóxico que los compuestos metilados y 10 veces más tóxico que el arseniato³⁸. La problemática del arsénico es debido a su fácil movilización bajo condiciones naturales. No obstante, el hombre ha cumplido un papel importante en la generación de formas tóxicas del As a través de las actividades mineras, uso de los combustibles fósiles, el uso de herbicidas, pesticidas y desecantes agrícolas³⁸.

2.6.3.1 Manifestaciones Clínicas del Arsénico

Es conocido desde ya años atrás que la exposición crónica al arsénico puede conllevar a efectos adversos a la salud humana, todo esto se evidencia en el estudio realizado por

Hutchington en el año 1888 se evidencian los primeros antecedentes que relacionaron la presencia de arsénico en agua y lesiones cutáneas como hiperpigmentación, hiperqueratosis y cáncer de piel^{39,41}.

En Brasil, se están recopilando datos de la presencia de arsénico en suelos, sedimentos y aguas subterráneas, en áreas que por más de 300 años tuvieron una fuerte actividad minera y se han detectado un potencial daño a la salud de las poblaciones aledañas a los lugares afectados³⁹.

Mediante numerosos estudios se ha evidenciado que una larga exposición al As causa lesiones características en la piel, las cuales incluyen alteraciones en la pigmentación, queratosis en la palma de las manos y plantas de los pies, hiperqueratosis y cáncer de piel³⁹.

2.6.4 Antimonio

El antimonio Sb es un elemento químico con número atómico 51, está dentro del grupo de los metaloides además es un elemento similar al arsénico a lo se refiere a toxicidad, este elemento no es muy común o abundante en la naturaleza, ya que se suele encontrar en mezclas isomorfas con arsénico (allemonita). Forma parte por lo general de los minarles, Ag, Co, Pb, al estar juntos a estos minerales es usual que sea extraído en proceso mineros⁴².

2.6.4.1 Antimonio y medio ambiente

El Sb se lo encuentra en baja concentración en el medio ambiente, este metal se introduce al ambiente gracias a su procesamiento y extracción todo esto mediante la producción de metal antimonio, cantidades pequeñas de Sb son liberadas al medio ambiente mediante chimeneas de industrias y combustión de carbón⁴².

2.6.4.2 Efectos del antimonio en la salud

El antimonio puede modificar el metabolismo de las personas que lo ingieren, se puede estar expuesto al Sb al respirar, beber agua o ingerir alimentos que estén contaminados con Sb. Estudios han determinado que los efectos sobre la salud del antimonios se da cuando el antimonio está enlazado con el hidrogeno. Los efectos adversos van a depender del periodo de exposición y la cantidad ingerida van a ser de grado normales y crónicos por su parecido al As⁴².

La concentración de Sb en el suelo depende de la zona donde se mida, normalmente la cantidad que se puede encontrar es baja, por debajo de 1 ppm. Sin embargo se han encontrado zonas que la concentración de Sb es mayor a los 9 ppm, están son zonas cercanas a industrias que trabajan con antimonio.

2.6.4.3 *Fundamento Espectrofotometría de absorción atómica*

Cuando un átomo se le suministra en estado fundamental determinada energía, esta será absorbida por el átomo, llevándolo a un nuevo estado energético (estado excitado), cuando el átomo vuelve a su estado normal, cede una determinada cantidad de energía idéntica de forma cuantitativa a su energía de excitación, emitiendo a una determinada longitud de onda radiaciones⁴³.

2.7 *Caenorhabditis elegans como modelo experimental*

2.7.1 *Características*

El nematodo *C. elegans* habita en el suelo distribuido en la mayoría del planeta, se alimenta de plantas y frutas además de raíces en descomposición y bacterias. El organismo mide aproximadamente 100 μm y propuesto como organismo para estudios genéticos en la década de los 60 por Sydney Brenner por su fácil manipulación experimental, simplicidad y bajo costo, presentando una anatomía simple y transparente⁴⁴.

2.7.2 *Ciclo de vida*

El ciclo de vida del *C. elegans* es de tres días y medio a una temperatura ideal de 20°C tiempo en el cual presenta cuatro estadios larvarios (L1-L4) alcanzando la adultez. En cada fase larvaria culmina con una muda, sintetizando una nueva cutícula y desprendiéndose de la antigua. El nematodo adulto vive entre 10 a 15 días, durante ese tiempo es fértil cuatro días llegando a producir 300 embriones, siendo el límite el volumen de esperma producido, pero su número puede aumentar si se aparea con un macho⁴⁴.

En la etapa final del estadio larvario L1 si las condiciones no son favorables para el crecimiento, existe la probabilidad de entrar en un estado de arresto y resistencia denominado larva Dauer. La alteración ambiental, exceso de temperatura o escasez de comida impide el desarrollo de una larva L2 transformándose en L2d. Aunque posee el potencial para formar una larva Dauer como L3, conforme resista a las condiciones

perjudiciales. La muerte de la larva Dauer se produce en unos meses por la transformación de L2d, puesto que las condiciones ambientales adversas continúan. La fase Dauer culmina al experimentar un hábitat propicio al alimentarse en un lapso de una hora, luego al cabo de 2-3 horas comienza a nutrirse y termina por mudar en 10 horas a estadio larval L4⁴⁴.

2.7.3 Modelo toxicológico

La investigación realizada “*Caenorhabditis elegans* como bioindicador en estudios de la toxicidad ambiental en agua y sedimentos”⁴⁵, expresa la gran importancia de empleo del nematodo *Caenorhabditis elegans* para indicar el grado de toxicidad en muestras de agua y sedimentos, los ensayos planteados de mortalidad, reproducción y crecimiento, muestran el índice de contaminación, por tal motivo la aplicación de estos bioensayos conlleva a resultados evidentes⁴⁶.

El uso de ensayos biológicos proporciona información sobre posibles riesgos ambientales empleando organismos indicadores, incluso con la presencia de toxicidad en metales pesados. Los efectos agudos en bioensayos in vivo e in vitro se expresa por la exposición a metales a corto plazo a diferencia de la toxicidad crónica que a bajas concentraciones se exponen los organismos indicadores a largo plazo⁴.

CAPÍTULO III

3. Metodología

3.1 Tipo de Diseño de Investigación

Esta investigación es de tipo cuasi experimental ya que las técnicas y procedimientos ejecutados no se han llevado a cabo por primera vez, hemos utilizado técnicas confiables descritas en artículos científicos.

3.1.1 Identificación de variables.

3.1.1.1 Variable independiente.

- Concentraciones de metales pesados en los extractos de los relaves mineros

3.1.1.2 Variables dependientes.

- Mortalidad del *Caenorhabditis elegans*.
- Concentración letal media (CL₅₀).

3.1.2 Población y muestra

3.2.2.1 Población

- Relaves mineros en puntos estratégicos del cantón Portovelo, de la provincia del Oro.

3.2.2.2 Muestra

- Extractos acuosos de relaves mineros del Cantón Portovelo.

3.2 Materiales, equipos y reactivos

Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación 50 ml, 100 ml.
- Tubos de ensayo
- Micro puntas
- Tubo fondo cónico de 2 ml, 15 ml

- pH-metro
- Probeta 25 ml, 1000 ml
- Erlenmeyer 500 ml, 1000 ml
- Cajas Petri
- Micropipetas
- Pipetas Pasteur
- Lámpara de alcohol
- Lámpara de luz blanco
- Tamiz de acero 63 um
- Espátula

Equipos

- Estufa
- Espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu (AA-6300)
- Centrifuga marca Dynac
- Refrigerador Electrolux
- Incubadora
- Estereoscopio marca Labomed (CZM6)
- Potenciómetro
- Autoclave
- GPS 72 H Garmin
- Balanza analítica

Sustancias

- Agar K
- Medio K
- Sustancia blanqueadora
- Agua destilada
- Agua MiliQ
- Alcohol industrial
- Alcohol potable
- Peptona

- NaCl
- NaOH

Material biológico

- *Nematodos Caenorhabditis elegans cepa N2*
- *Escherichia coli* OP50

Otros materiales

- Tijeras
- Papel Aluminio
- Toallas absorbentes
- Papel Aluminio
- Fundas con cierre hermético
- Cinta de cartón

3.3 Técnicas y métodos

3.3.1 Recolección de muestras de relaves mineros

Los puntos de muestreo de relaves mineros fueron seleccionados y recolectados en 2 estaciones, en el sector de procesamiento del mineral en la extracción del oro: el Pache, y otra en el vertedero de relaves el Tablón. Usando una espátula, fueron obtenidas tres submuestras de cada lugar para obtener aproximadamente 0.5 Kg de muestra compuesta a una profundidad de 0-10 cm^{8,47}.

Para su transporte se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético en una caja cooler con hielo para mantener las muestras a baja temperatura y transportadas al laboratorio donde fueron almacenadas a -10°C en un frízer. Los relaves se disgregaron con un mortero de porcelana y fueron tamizados con malla metálica < 63 µm para obtención de la fracción fina y almacenados a -10°C⁵.

3.3.2 Obtención de extracto acuoso

Para la obtención de extracto líquido, 15 g de muestra fueron mezclados con 15 ml de agua destilada en vaso de precipitación de 50 ml hasta completa homogenización. Las mezclas fueron almacenadas a 4°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se homogeneizó la

suspensión que fue transferida a tubos de extracción previamente preparados con micro malla metálica y lana de vidrio para eliminar la mayor cantidad de sedimentos. Posteriormente se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 4500 rpm para recolectar así nuestro extracto acuoso repitiendo el procedimiento hasta obtener un volumen adecuado de extracto⁵.

3.3.3 Equipo Analítico

Para la cuantificación de los metales pesados presentes en los extractos de los relaves mineros se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica marca Shimadzu modelo AA-6300 con capacidad de operación en el rango de longitudes de onda entre 185 a 900 nm⁴³.

3.3.3.1 Determinación de metales pesados mediante espectrofotometría de Absorción atómica

La técnica empleada fue espectrofotometría de absorción atómica por flama Aire acetileno, basados en APHA-AWWA-WEF parte 3111-B.

3.3.3.2 Recta de calibrado

Para cada metal a analizar se estableció la calibración con concentraciones conocidas empleando patrones preparados a partir de diluciones diferentes de una solución estándar (1000mg/l) del metal a determinar⁴³.

3.3.3.3 Análisis de muestras

Los metales analizados en este estudio fueron: Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), Antimonio (Sb) y Arsénico (As).

- Se transportaron las muestras listas para su respectivo análisis en el espectrofotómetro.
- Se encendió el espectrofotómetro de Absorción Atómica, según las indicaciones de fábrica.
- Se realizaron las respectivas calibraciones del espectrofotómetro para cada uno de los análisis a realizar.
- Una vez obtenida la recta de calibración, se puede proceder a realizar la lectura de la concentración de metal por cada muestra.

3.3.4 Preparación de medios para ensayos toxicológicos

3.3.4.1 Medio K

Solución salina utilizada en procesos múltiples referentes a investigaciones con el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se pesan la cantidad de 1.38 g de cloruro de potasio y 1.5 g de cloruro de sodio colocando en un Erlenmeyer si se requiere un volumen de 500 ml de agua mili Q, procurando una mezcla homogénea. Posterior a ello se coloca en la autoclave con un tiempo de aproximadamente una hora, luego dejar enfriar y poner en un frasco lavador⁵.

3.3.4.2 Agar K

Es el medio o césped de crecimiento del nematodo *Caenorhabditis elegans*. El volumen utilizado es de 500 ml de agua mili Q, por lo tanto, se pesan 1.18 g de cloruro de potasio, 1.5 g de cloruro de sodio, 1.25 g de peptona y 8.5 g de agar, todos ellos agregados en un Erlenmeyer de 500 ml, procurando tapar la boca del Erlenmeyer con papel aluminio. Una vez disuelto el medio se debe esterilizar para evitar el crecimiento de contaminantes, llevándolo a la autoclave a una temperatura de 120°C por 30 min⁵.

Desinfectar el área de trabajo con alcohol para evitar contaminación por levaduras, hongos, o cualquier microorganismo. Una vez estéril repartir en placas de Petri estériles y dejar en reposo para que solidifique.

3.3.4.3 Mantenimiento de la cepa de *Caenorhabditis elegans*

Para el mantenimiento del *C. elegans* se preparó agar selectivo que sirve como césped para el nematodo, alimentándolo con bacterias *Escherichia coli* OP50 cada 2 días administrando 1 ml de la suspensión bacteriana a los *C. elegans*⁴⁸, haciendo referencia al protocolo plasmado por la CGC (Centro Genético de *Caenorhabditis*) y usando la metodología estándar descrita por Brenner⁴⁸, en la cual se utiliza agar, peptona y cloruro de sodio disueltos en agua miliQ y autoclavados a 120°C por 1 hora, para luego adicionarle Colesterol, MgSO₄ y CaCl₂, siendo puestos en cajas Petri, donde luego se colocará como alimentos del *Caenorhabditis elegans*, las bacterias *Escherichia coli* OP50⁴⁹. Esta bacteria puede mantenerse a 4°C en caldo LB incubadas a 34°C por 24 h, y se puede mantener durante varios meses⁵⁰.

3.3.4.4 Sincronización

Este proceso es utilizado para trabajar con el *C. elegans* en un solo estadio larvario, desechando los nematodos adultos y quedando sólo los huevos. Para ello se verificó en las placas Petri si había una cantidad considerable de huevos para proceder a lavarlo con medio K⁵¹, y colocarlos en tubos falcón, donde se mantenían en hielo para evitar la eclosión de los huevos, estos fueron centrifugados a 3000 rpm por 5 min, luego se desecha el sobrenadante y se agregó hipoclorito de sodio al 15% el cual destruye las larvas sin afectar a los huevos gracias a su cubierta protectora⁵². Se centrifuga otra vez a 3000 rpm por 5 min para separar el sobrenadante repitiendo este proceso una vez más. Se realizan cuatro lavados con medio K con la finalidad de eliminar la solución de hipoclorito de sodio y el residuo final se mezcló con 1 ml de medio K para pasarlos a cajas Petri donde los huevos eclosionan a larvas L1⁵².

3.3.4.5 Diluciones de los extractos

Se realizó las diluciones siguiendo en gran parte el método utilizado en “Perfil toxicológico de los sedimentos del Río Magdalena usando como modelo biológico *Caenorhabditis elegans*”⁵, realizamos diluciones secuenciadas de forma descendente 100, 75, 50 y 25, 20,10 y 0.5, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 y 0.00625 %, hasta lograr encontrar un nivel de mortalidad alta y así poder encontrar nuestro CL₅₀.

3.3.4.6 Punto de goteo

El traspaso del *Caenorhabditis elegans* para el ensayo de mortalidad se realizó por punto de goteo, que consiste en diluciones con uso un tubo cónico de 2 ml y de micropipeta graduable (0.5-20 uL). Se coloca una gota sobre un portaobjetos que a través de una observación de un microscopio binocular se cuenta el total de los nematodos en dicha gota, se realizan las diluciones que sean necesarias hasta obtener el intervalo de 10-15 nematodos. Una vez que se obtiene la dilución correcta se coloca tres gotas sobre el portaobjetos para sacar la media.

3.3.5 Bioensayo en extracto acuoso

3.3.5.1 Ensayo de mortalidad

Los nematodos (*C. elegans*) fueron cultivados en placas de Petri con agar K y fueron lavados con medio K. Los nematodos en estado larvario L4 fueron traspasados en microplacas de 96 pocillos con las diluciones respectivas de cada muestra aplicando punto de goteo. Para cada tratamiento se realizó triplicado y como control se emplearon dos soluciones, agua ultrafiltrada tipo 1 y Medio K, luego del tiempo establecido de lecturas 12, 24, 36 y 48 horas bajo de observación de microscopio binocular se reporta el número de organismos vivos y muertos⁵.

CAPÍTULO IV

4.1 Resultados y Discusión

Los cuadros 1 y 2 muestran los resultados de mortalidad de *Caenorhabditis elegans* expuestos a las distintas concentraciones de los extractos de los relaves mineros a las 12, 24, 36 y 48 horas, para las muestras obtenidas en las dos estaciones estudiadas.

Cuadro 1. Mortalidad CL 50 del Caenorhabditis Elegans en extracto acuoso en muestra de relaves minero del sector el Pache. Fuente: Realizado por Ricardo Domínguez y Christopher Pogo

Ensayo de mortalidad					
MUESTRA 1					
Concentración	Expuestos	Muertos			
		12 h	24 h	36 h	48 h
Blanco Medio K	15	0	0	0	0
Blanco Medio K	13	0	0	0	0
Blanco Medio K	16	0	0	0	0
0,00625	12	1	1	1	1
0,00625	13	0	0	0	0
0,00625	13	1	1	1	1
0,0125	10	0	1	1	1
0,0125	11	0	1	1	1
0,0125	9	1	1	1	1
0,025	10	1	1	2	2
0,025	12	1	1	1	1
0,025	13	1	1	1	1
0,05	11	1	1	1	3
0,05	11	2	1	2	4
0,05	12	3	3	3	3
0,1	10	2	2	2	2
0,1	9	3	4	4	4

0,1	10	2	2	3	3
0,2	12	4	6	6	6
0,2	10	4	5	5	6
0,2	11	3	4	5	5
0,4	10	5	6	8	8
0,4	12	4	5	6	6
0,4	12	3	6	6	7
0,5	10	6	8	10	10
0,5	10	5	5	10	10
0.5	10	5	6	10	10

Fuente: Autores

Cuadro 2. Mortalidad CL 50 del *Caenorhabditis Elegans* en extracto acuoso en muestra de relaves minero, vertedero de desechos mineros “El Tablón”. Fuente: Realizado por Damián Domínguez y Cristopher Pogo.

Ensayo de mortalidad					
MUESTRA 2					
Concentración	Expuestos	Muertos			
		12 h	24 h	36 h	48 h
Blanco Medio K	14	0	0	0	0
Blanco Medio K	12	0	0	0	0
Blanco Medio K	10	0	0	0	0
0.00625	14	0	0	0	0
0.00625	12	0	0	0	0
0.00625	13	0	0	0	0
0.0125	10	2	2	2	2
0.0125	15	1	1	1	1
0.0125	10	0	0	1	1
0.025	10	1	2	2	2
0.025	11	0	1	1	1

0.025	11	0	1	1	1
0.05	11	1	1	1	1
0.05	12	1	2	3	3
0.05	13	0	1	1	1
0.1	10	1	2	2	2
0.1	13	1	1	2	3
0.1	14	2	3	3	3
0.2	10	2	3	3	4
0.2	9	2	3	3	3
0.2	10	3	3	3	3
0.4	12	4	4	5	5
0.4	14	4	5	6	6
0.4	13	3	4	4	5
0.5	11	7	9	11	11
0.5	12	6	8	12	12
0.5	14	6	10	14	14

Fuente: Autores

Debido a que los porcentajes de mortalidad alcanzaron valores de 50% solo a las 36 y 48 horas, los datos correspondientes a 12 y 24 horas no fueron considerados para la determinación del LC₅₀. El cuadro 3 muestra la concentración de Hg, Cd, As y Sb en las estaciones analizadas. En la estación El tablón, la concentración de Hg detectada (214, 58 ppb) fue casi el doble de la concentración determinada en la estación el Pache (117,19 ppb) mientras que para el Arsénico en la estación el Pache la concentración de ese metal pesado fue (1298,81 ppm) mientras que en El Tablón fue de 43,14 ppm. En cuanto al metal Sb, en el Pache la concentración detectada fue de 91,87 ppm mientras que en El Tablón, no fueron detectadas trazas de ese metal.

Cuadro 3. Lugar, temperatura y concentración de metales pesados expresados en ppm y ppb.

MATRIZ DE INFORMACIÓN DE RELAVES MINEROS								
LUGAR TOMA DE MUESTRA	CÓDIGO	T. °C	FECHA	HORA	Metales pesados			
					Hg	Cd	As	Sb
EL PACHE- Plante de beneficio	M1	20°	2/7/2018	10:50 a. m.	117,186 ppb	3,94 ppm	1298,81 ppm	91,87 ppm
El Tablón	M2	20,1°	2/7/2018	11:32 a.m.	214,5788 ppb	5,9 ppm	43,14 ppm	0 ppm

Fuente: Autores

Las gráficas 1 y 2 muestran el modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad de *C. elegans* y concentración del extracto de relave minero a las 36 y 48 horas para la Estación El Pache. Las gráficas 3 y 4 muestran la relación entre mortalidad de *C. elegans* y dosis de los extractos de relave minero Estación El Pache a las 36 y 48 horas respectivamente. A partir de las ecuaciones de regresión incluidas dentro de las gráficas 3 y 4 se calculó el LC₅₀ que se encuentra tabulado en el cuadro 4.

Figura 1. Grafica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (36h) de *C. Elegans* y concentración del extracto de relave minero de la Estación El Pache.

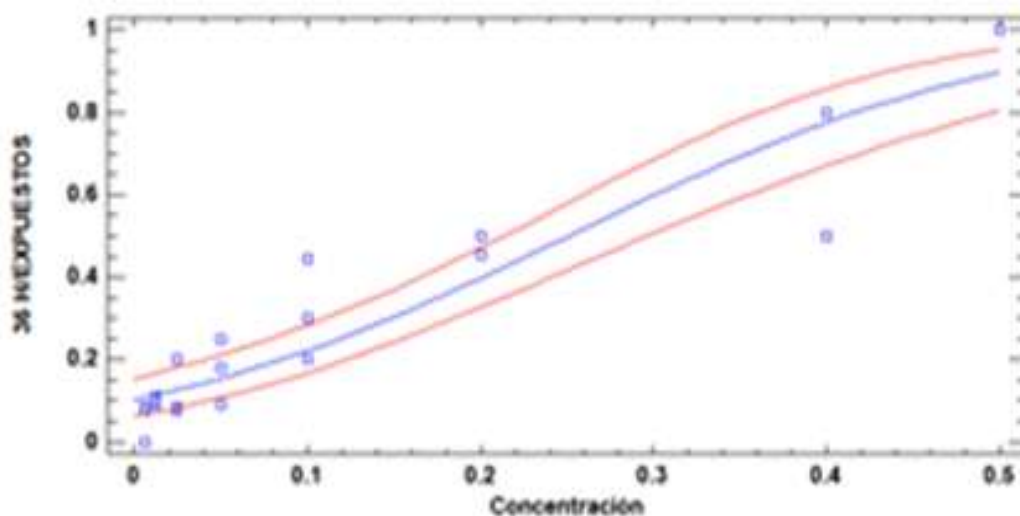


Figura 2. Grafica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (48h) de *C. elegans* y concentración del extracto de relave minero de la Estación El Pache.

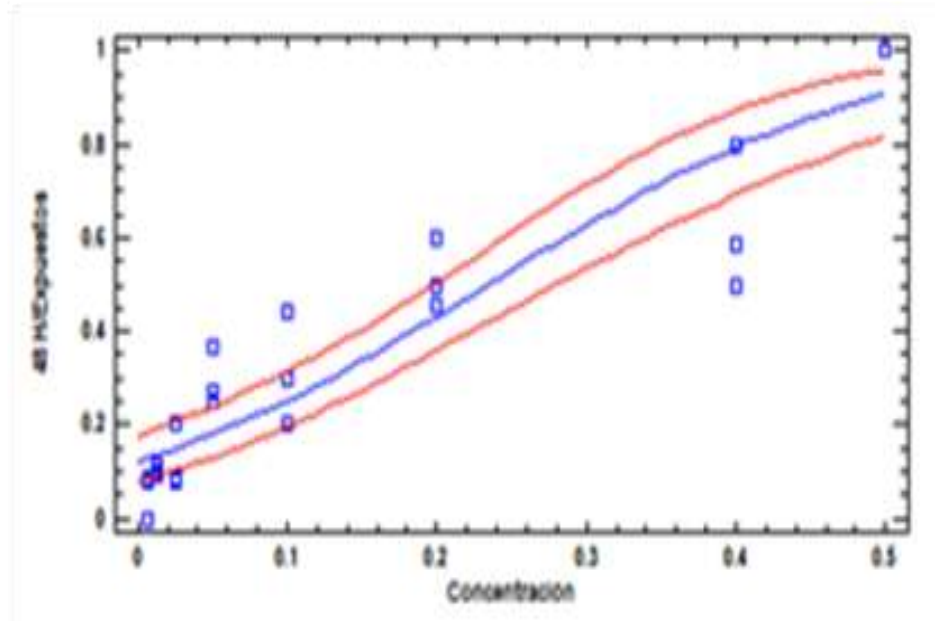


Figura 3. Relación entre mortalidad (36h) de *C. elegans* y dosis de los extractos de relave minero Estación El Pache. Dentro del cuadro se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.

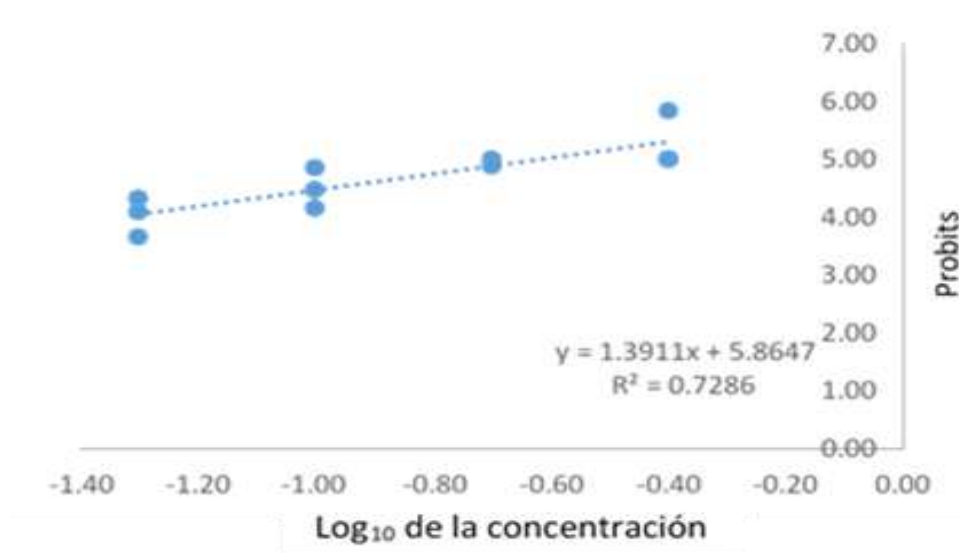
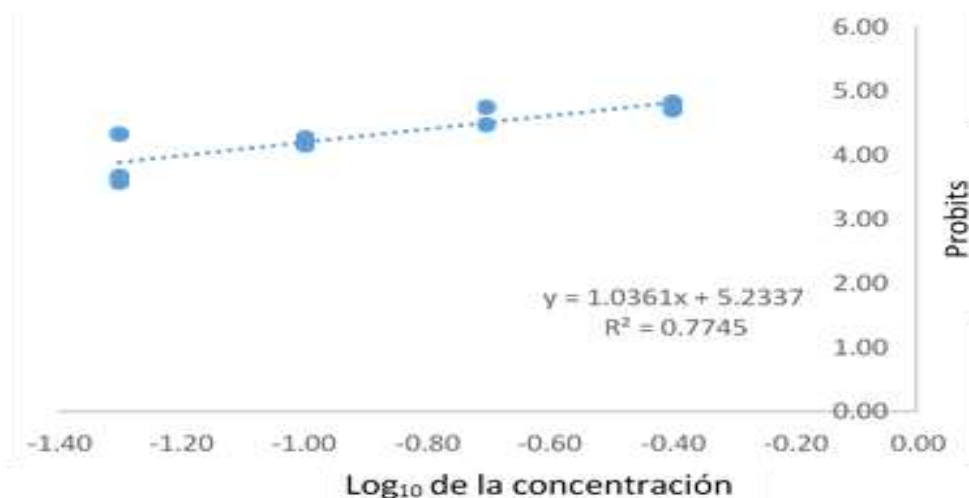


Figura 4. Relación entre mortalidad (48h) de *C. elegans* y dosis de los extractos de relave minero Estación El Pache. Dentro del cuadro se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.



Cuadro 4 Valores de LC_{50} para las muestras analizadas con sus respectivos límites de confianza obtenidos a partir de Predicciones Inversas para Concentración con las ecuaciones de regresión de los análisis Probit.

<i>Muestra</i>	<i>Tiempo</i>	<i>LC50</i>	<i>LC Inferior 95.0%</i>	<i>LC Superior 95.0%</i>	<i>Ecuaciones de regresión Probit</i>	<i>R²</i>
M1	36 horas	0.174	0.121	0.250	$Y = 5.865 + 1.391 X$	0.776
M1	48 horas	0.150	0.094	0.241	$Y = 5.699 + 1.041 X$	0.637
M2	36 horas	0.258	0.150	0.444	$Y = 5.098 + 0.959 X$	0.738
M2	48 horas	0.243	0.148	0.399	$Y = 5.234 + 1.036 X$	0.775

Fuente: Autores

De igual modo, las gráficas 5 y 6 muestran el modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad de *C. elegans* y concentración del extracto de relave minero a las 36 y 48 h para la Estación El Tablón mientras que las gráficas 7 y 8 muestran la relación entre mortalidad de *C. elegans* y dosis de los extractos de relave minero de esa estación y a

partir de las ecuaciones de regresión incluidas dentro de las gráficas 7 y 8 se calculó el LC_{50} que se encuentra tabulado en el cuadro 4.

Figura 5. Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (36h) de *C. elegans* y concentración de relave de la Estación El Tablón.

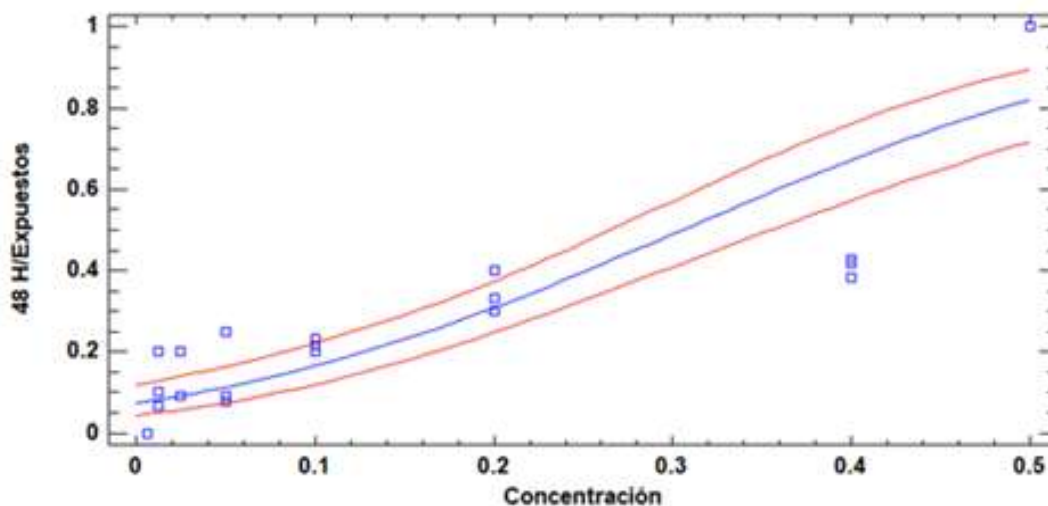


Figura 6. Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (48h) de *C. elegans* y concentración de relave de la Estación El Tablón.

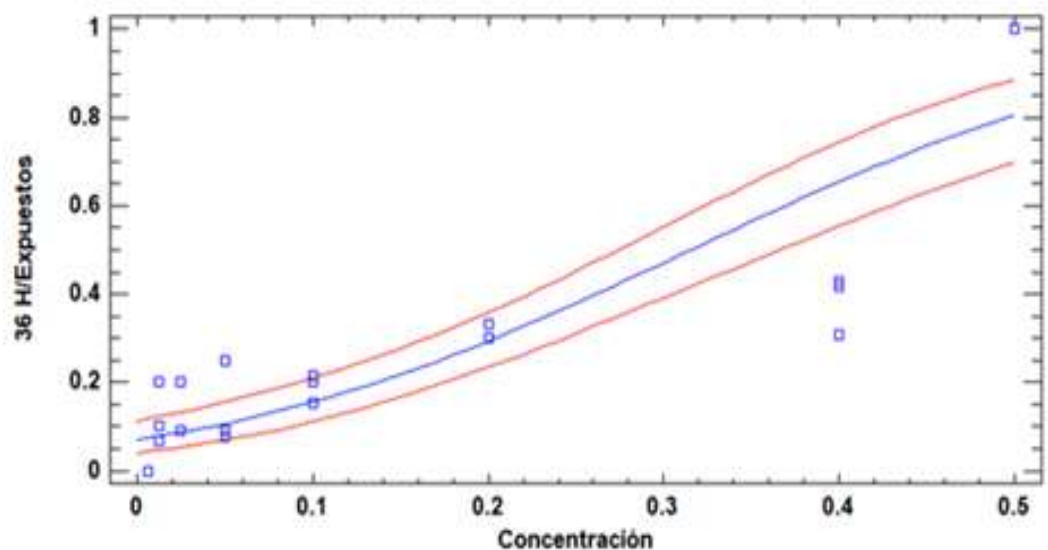


Figura 7. Relación entre mortalidad (36h) de *C. elegans* y dosis de los extractos de relave minero Estación El Tablón Dentro de la gráfica se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.

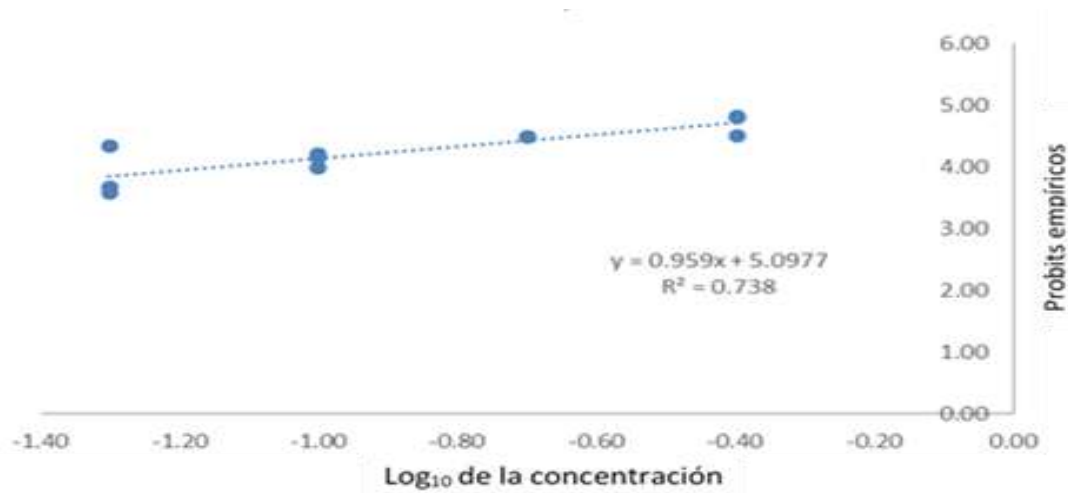
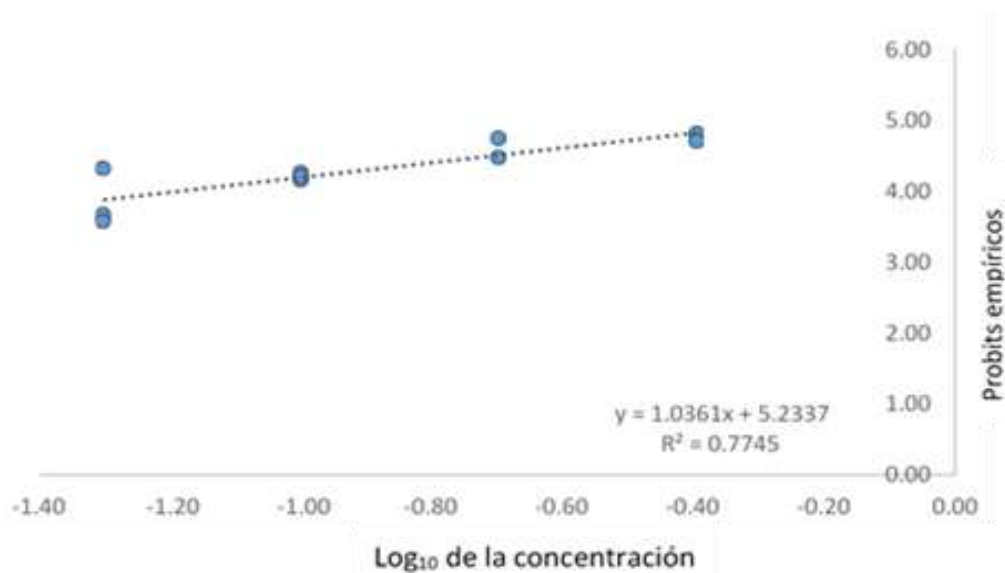


Figura 8. Relación entre mortalidad (48h) de *C. elegans* y dosis de los extractos de relave minero Estación El Tablón Dentro de la gráfica se indica la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.



Tanto a las 36 como a las 48 h de exposición, el relave que mostró mayor toxicidad fue el de la estación El Pache ya que se requirió de menores diluciones para producir el 50% de mortalidad en *Caenorhabditis elegans* bajo condiciones de laboratorio (Cuadro 4).

Debido a que la toxicidad de los compuestos metálicos depende de las modificaciones toxicocinéticas derivadas del tipo de molécula y dadas las concentraciones detectadas en las estaciones analizadas existe un serio riesgo para la salud humana y para la biodiversidad en general en esa región por los efectos que esos metales en el organismo. Por ejemplo, el mercurio orgánico es principalmente neurotóxico por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que el cloruro mercúrico es nefrotóxico al eliminarse por el riñón⁴⁰. El cadmio al igual que el mercurio es nefrotóxico manifestándose daño renal con proteinuria, además de ser el responsable de la disfunción tubular con incremento de daño glomerular⁵³. Otro metal causante de alterar el sistema nervioso es el arsénico, causante de neuropatía en los segmentos distales de las extremidades, además de provocar encefalopatía y degeneración axonal; además de involucrar daños vasculares en el hígado con sintomatología febril y anemia^{22,54}. Por otra parte el antimonio presenta los mismos efectos adversos que el arsénico, por lo que su exposición va a provocar alteraciones en el sistema nervioso y daño de hepatotoxicidad²⁶.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. El empleo de *C. elegans* permitió establecer dosis letales medias del extracto de relaves mineros que indican que en la estación El Pache existe un mayor riesgo por presentar mayores concentraciones mayor toxicidad.
2. Aunque en ambas estaciones existe niveles de Mercurio extremadamente elevados, los detectados en El Tablón duplican a los determinados en El Pache.
3. En la estación El Pache las concentraciones de Arsénico son extremadamente elevadas en comparación con las de El Tablón que aunado la presencia de mercurio en los niveles encontrados, pudiera explicar la mayor toxicidad del relave de esa estación quizás a causa de un efecto sinérgico entre Mercurio y Arsénico.
4. Dados los niveles de mercurio, Cadmio, Arsénico y Antimonio detectados en las localidades analizadas, la contaminación por metales pesados en las estaciones analizadas reviste un riesgo importante para los habitantes de la región.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

1. Dados los niveles de contaminación y la toxicidad de los relaves mineros en la localidad estudiada es recomendable establecer protocolos adecuados para disponer de los desechos tóxicos.
2. Se recomienda emplear medidas de remediación para atenuar los efectos de contaminación por metales pesados en la región estudiada.
3. También es necesario diseñar una campaña de información y concientización sobre el problema detectado a la comunidad para que los pobladores estén al tanto de los riesgos a los cuales está expuesta su la salud.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mesa, C.; Alfonso, P.; Monterde, E.; Casarramona, M.; Santacreu, M. Enfoque de Los Proyectos de Cooperación En La Minería Artesanal Y Pequeña Minería. *Congr. Int. sobre Geol. y Minería en la Ord. del Territ. y en el Desarro.* **2009**, 243–254.
- (2) Peña-Carpio, E.; Menéndez-Aguado, J. M. Environmental Study of Gold Mining Tailings in the Ponce Enriquez Mining Area (Ecuador) Estudio de Las Colas de Tratamiento de Oro de La Explotación Minera En Ponce Enríquez (Ecuador) Desde Una Perspectiva Ambiental. **2016**, 83 (195), 237–245. <https://doi.org/10.15446/dyna.v83n195.41745>.
- (3) Jonh Astete, Walter Cáceres, María Gastañaga, Martha Lucero, Iselle Sabastizaga, Tania Oblitas, Jessie Pari, F. R. Intoxicación por plomo y otros problemas de salud en niños de poblaciones aledañas a relaves mineros. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2018**, 103 (2), 217–223. <https://doi.org/10.1002/cpt.878>.
- (4) Shen, L.; Xiao, J.; Ye, H.; Wang, D. Toxicity Evaluation in Nematode *Caenorhabditis Elegans* after Chronic Metal Exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, 28 (1), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.009>.
- (5) Tejeda, L.; Olivero, J. Perfil Toxicológico de Los Sedimentos Del Río Magdalena Usando Como Modelo Biológico *Caenorhabditis Elegans*; 2016.
- (6) Prada Trigo, J. Desarrollo Territorial En Tres Ciudades Medias Ecuatorianas: Efecto de Las Estrategias Locales En La Aplicación Del Plan Nacional Del «Buen Vivir» Y El Cambio En La Matriz Productiva. *Territ. Dev. three Mediu. cities Ecuadorian cities Eff. local Strateg. Implement. Natl. Plan Good Living Chang. Product. matrix* **2016**, 55 (1), 125–148.
- (7) Patricio López; Sebastián Ainzúa; Cristobal Zolezzi; Paola Vasconi. La Minería Y Su Pasivo Ambiental. *Análisis de Políticas Públicas* **2003**, 24, 1–16.
- (8) Montenegro, G.; Fredes, C.; Mejías, E.; Bonomelli, C.; Olivares, L. Contenidos De Metales Pesados En Suelos Cercanos a Un Relave Cuprífero Chileno Content of Heavy Metals in Soils Near a Chilean Copper Mining Tailing. *Agrociencia* **2009**, 43 (4), 427–435.
- (9) Espinosa, Enrique; Maldonado, Maldonado A. V. Análisis comparativo del método ácido con los métodos tradicionales usados en la recuperación de oro en el distrito minero Zaruma-

- Portovelo, 2014, Vol. 8.
- (10) Larenas Herdoíza, D.; Fierro-Renoy, V.; Fierro-Renoy, C. Minería a Gran Escala: Una Nueva Industria Para Ecuador. *Polémika* **2017**, 5 (12), 67–91.
 - (11) Aguilar, J. Plan Estratégico Para El Desarrollo Del Turismo Sostenible En El Cantón Portovelo, Provincia de El Oro 2015-2020, 2015.
 - (12) Murillo, R. Zaruma, Historia Minera Identidad En Portovelo, 2000.
 - (13) Freire, A. Evaluación de La Cultura Tributaria Del Sector Minero Informal En La Provincia de El Oro, 2018.
 - (14) La Rotta, Ángela; Torres, M. Explotación Minera Y Sus Impactos Ambientales Y En Salud. El Caso de Potosí En Bogotá. *Saúde Debate* **2017**, 41 (112), 77–91.
<https://doi.org/10.1590/0103-1104201711207>.
 - (15) Pantoja, Freddy; Pantoja, S. Problemas Y Desafíos de La Minería de Oro Artesanal Y En Pequeña Escala En Colombia. *Rev Fac Cienc Econ* **2016**, 14 (2), 147–160.
<https://doi.org/10.18359/rfce.2217>.
 - (16) Juárez, F. La Minería Ilegal En Colombia: Un Conflicto de Narrativas. *Ágora U.S.B.* **2016**, 16 (1), 135–146.
 - (17) Carrizo, S.; Forget, M.; Denoël, M. Implantaciones Mineras Y Trayectorias Territoriales. El Noroeste Argentino, Un Nuevo Centro Extractivo Mundial. *Rev Estud Soc* **2015**, 40 (55), 120–136. <https://doi.org/10.7440/res55.2016.08>.
 - (18) Castro, L. Minería de Oro Artesanal Y a Pequeña Escala En Timbiquí-Cauca : Una Aproximación Histórica a Sus Efectos. **2011**.
 - (19) Romero Añazco, V. D. La Ley de Minería Del Ecuador Y Su Aplicación En Los Ríos Pache Y Rio Amarillo , Por La Explotación Minera En Los Cantones Portovelo Y Zaruma de La Provincia Del Oro – Ecuador. **2014**.
 - (20) Lopez Bravo, M.; Santos Luna, J.; Quezada Abad, C.; Segura Osorio, M.; Perez Rodriguez, J.; Rodriguez, J. P. Actividad Minera Y Su Impacto En La Salud Humana / The Mining and Its Impact on Human Health. *Cienc. Unemi* **2016**, 9 (17), 92.
<https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss17.2016pp92-100p>.

- (21) Güiza, L. La Minería Manual En Colombia: Una Comparación Con América Latina. *Boletín Ciencias la Tierra* **2014**, No. 35, 37–44. <https://doi.org/10.15446/rbct.n35.37056>.
- (22) Londoño Franco, L. F.; Londoño Muñoz, P. T.; Muñoz Garcia, F. G. Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* **2016**, 14 (2), 145–153. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153).
- (23) Reyes, Yulieth; Vergara, Inés; Torres, Omar; Díaz Mercedes; González, E. Contaminación Por Metales Pesados: Implicaciones En Salud, Ambiente Y Seguridad Alimentaria. *Rev. I2+D* **2016**, 16 (2), 66–77. <https://doi.org/10.1007/BF02796157>.
- (24) Alcalá, J.; Rodríguez, J.; Villaseñor, M.; Hernández, A.; García, M.; Beltrán, A.; Rodríguez, H. Vegetación Bioindicadora de Metales Pesados En Un Sistema Semárido. *Rev FCA UNCUYO* **2013**, 45 (1), 27–42.
- (25) Castellano Calero C; Pezzi Careto Ma, Fernandez Vázquez, M. O. Evaluación riesgos potenciales asociados a captaciones de aguas de consumo en polígono industrial (Casares - Málaga). **2009**.
- (26) Astete, Jonh; Gastañaga, María; Pérez, D. Niveles de Metales Pesados En El Ambiente Y Su Exposición En La Población Luego de Cinco Años de Exploración Minera En Las Bambas, Perú 2010. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* **2014**, 31 (4), 695–701.
- (27) Tejada, C.; Villabona, Á.; Garcés, L. Adsorción de Metales Pesados En Aguas Residuales Usando Materiales de Origen Biológico. *Tecnológicas* **2015**, 18 (34), 109–123. <https://doi.org/10.22430/22565337.209>.
- (28) María, R.; Cárdenas, Z.; Torres, L. G.; Aranguré, F. J.; Manuel, J.; Aguirre, O.; Carlos, J.; Limas, P.; Ángel, M.; Rodríguez, E. El Mercurio Y Sus Consecuencias En La Salud. **2014**, No. 17, 41–48.
- (29) Raiman, Ximena; Rodríguez, Lorena; Chávez, Paulina; Torrejón, C. Mercurio En Pescados Y Su Importancia En La Salud. *Rev Med Chile* **2014**, 142, 1174–1180. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014000900012>.
- (30) Huamán, E.; Vicuña, D.; Visitación, L.; Flores, L. Efecto Tóxico Y Ecotoxicológico de Arenas Negras de La Minería Artesanal En Madre de Dios. *Rev Soc Quím Perú* **2017**, 83 (4), 403–411.

- (31) Valderas, J.; Mejías, M.; Riquelme, J.; Aedo, K.; Aros, S.; Barrera, F. Intoxicación Familiar Por Mercurio Elemental. Caso Clínico. *Rev Chil Pediatr* **2013**, *84* (1), 72–79.
<https://doi.org/10.4067/S0370-41062013000100009>.
- (32) Ramirez, Lenin; Coba, P. Aislamiento, Caracterización Y Conservación De Bacterias No Entéricas Con Capacidad De Adaptación En Altas Concentraciones De Plata, Presentes En Una Laguna De Sedimentación De La Planta Minera Del Sector El Pache-Portovelo-El Oro. **2012**, No. March, 89.
- (33) Diaz, F. Mercurio En La Minería Del Oro: Impacto En Las Fuentes Hídricas Destinadas Para Consumo Humano. *Rev Salud Pública* **2014**, *16* (6), 947–957.
<https://doi.org/10.15446/rsap.v16n6.45406>.
- (34) Sánchez, G. Ecotoxicología Del Cadmio. **2016**, 2–12.
- (35) Judith Espinoza, Y. Q. “Determinación cuantitativa de arsénico, cadmio y plomo en maca (*Lepidium meyenii*) expendida en el mercado 10 de octubre durante el período de junio – OCTUBRE 2016,” Universidad WIENER, 2016.
- (36) Jiménez, C. Estado Legal Mundial Del Cadmio En Cacao (*Theobroma Cacao*): Fantasía O Realidad. *Prod. + Limpia* **2015**, *10* (1), 89–104.
- (37) García, P. E. P.; Cruz, M. I. A. Los Efectos Del Cadmio En La Salud. *Rev. Espec. Médico-Quirúrgicas* **2012**, *17* (3), 199–205.
- (38) Rangel, E.; Montañez, L. E.; Luévanos, M.; Balagurusamy, N. Impacto Der Arsenico En El Ambiente Y Su Transformacion Por Microorganismos. *Terra Latinoam.* **2015**, *33* (2), 103–118.
- (39) Carabantes, A. G.; Fernicola, N. A. G. G. de. Arsénico En El Agua de Bebida: Un Problema de Salud Pública. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **2003**, *39* (4), 365–372.
<https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400003>.
- (40) Bolanos, J. Determinación de Arsénico En Agua Potable Del Cantón Del Grecia. *Rev. las Sedes Reg.* **2016**, *17* (35), 1–11. <https://doi.org/10.15517/isucr.v17i35.25561>.
- (41) Morales, Dante; Avendaño, Edgardo; Zevallos, Daniel; Fernández Julio; Mendoza, Z. Riesgo Ambiental Por Arsénico Y Boro En Las Cuencas Hidrográficas Sama Y Locumba de Perú.

- Medisan* **2018**, 22 (4), 166–173.
- (42) Soler Gallardo, I. Estudio de La Migración de Antimonio En Refrescos Envasados En PET, 2016.
- (43) Buscio, V.; Álvarez, M. D.; Gutiérrez Bouzán, M. C. Determinación de Metales Pesados En Tejidos Mediate Espectroscopia de Absorción Atómica Con Atomización Electrotérmica. *Boletín Intexter* **2009**, 17–24.
- (44) Salinas Grecco Co-supervisor, G.; Miranda Vizuete, A. Uso Del Modelo Experimental QF Lucía Otero Larre Borges. **2014**.
- (45) V. Gonzalez, R. Dominguez, D. Benítez, C. R. C. Elegans Como Organismo Modelo En Estudios de La Toxicidad Ambiental En Agua Y Sedimentos C.elegans. **2017**, 91, 399–404.
- (46) Peña, Zyanya; Piña, D.; Gómez, Maricela; Salazar, Luis; Aguilar, Gabriela; Arellano, F. El Nematodo Caenorhabditis Elegans Como Modelo Para Evaluar El Potencial Antihelmíntico de Extractos de Plantas. *Rev Mex Cienc Pecu* **2017**, 8 (3), 279–289.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i3.4504>.
- (47) Otero, L.; Romanelli-Cedrez, L.; Turanov, A. A.; Gladyshev, V. N.; Miranda-Vizuete, A.; Salinas, G. Adjustments, Extinction, and Remains of Selenocysteine Incorporation Machinery in the Nematode Lineage. *Rna* **2014**, 20 (7), 1023–2034.
<https://doi.org/10.1261/rna.043877.113>.
- (48) Montalvão, S. C. L.; Castro, M. T. de; Soares, C. M. S.; Blum, L. E. B.; Monnerat, R. G.; Caenorhabditis Elegans as an Indicator of Toxicity of Bacillus Thuringiensis Strains to Meloidogyne Incognita Race 3. *Ciência Rural* **2018**, 48 (7). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170712>.
- (49) LI, Y.; WANG, Y.; YIN, L.; PU, Y.; WANG, D. Using the Nematode Caenorhabditis Elegans as a Model Animal for Assessing the Toxicity Induced by Microcystin-LR. *J EnvironSci* **2009**, 21 (3), 395–401. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62282-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62282-2).
- (50) Li, Y.; Yu, S.; Wu, Q.; Tang, M.; Pu, Y.; Wang, D. Chronic Al₂O₃-Nanoparticle Exposure Causes Neurotoxic Effects on Locomotion Behaviors by Inducing Severe ROS Production and Disruption of ROS Defense Mechanisms in Nematode Caenorhabditis Elegans. *J. Hazard. Mater.* **2012**, 219–220, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.083>.

- (51) Ya-peng, C.; Fu-hong, X. I. E.; Jing, Y.; Jing-hua, L. U.; Shi-jun, Q. Screening for a New Streptomyces Strain Capable of Efficient Keratin Degradation. *J EnvironSci* **2007**, *19* (7), 1125–1128.
- (52) Parada Ferro, L. K.; Gualteros Bustos, A. V.; Sánchez Mora, M. R. Caracterización Fenotípica de La Cepa N2 de Caenorhabditis Elegans Como Un Modelo En Enfermedades Neurodegenerativas. *Nova* **2017**, *15* (28), 69. <https://doi.org/10.22490/24629448.2080>.
- (53) Flores, M.; Arroyo, S.; Ortiz, B.; Quiroz, G.; Enrique, L.; Ruiz, G.; Concepción, M. Cadmio: Efectos Sobre La Salud. Respuesta Celular Y Molecular Cadmium: Effects on Health. Cellular and Molecular Response. *Acta Toxicol. Argent* **2013**, *21* (1), 33–49.
- (54) Ramírez, A. V. Exposición Ocupacional Y Ambiental Al Arsénico. Actualización Bibliográfica Para Investigación Científica. *An Fac med.* **2013**, *74* (3), 237–247.
- (55) Presidencia de la Republica del Ecuador. Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente. Libro VI Anexo 2. Norma de Calidad Ambiental Del Recurso Suelo Y Criterios de Remediación Para Suelos Contaminados. **2017**, 18.

ANEXOS

Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados⁵⁵

Figura 9. Normas de calidad del suelo expresado en mg/kg

Criterios de Calidad de Suelo		
Sustancia	Unidades (Concentración Peso Seco)	en Suelo
Parámetros Generales		
Conductividad	mmhos/cm	2
PH		6 a 8
Relación de Adsorción de Sodio (Índice SAR)		4
Parámetros Inorgánicos		
Arsénico (inorgánico)	mg/kg	5
Azufre (elemental)	mg/kg	250
Bario	mg/kg	200
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	1
Cadmio	mg/kg	0.5
Cobalto	mg/kg	10
Cobre	mg/kg	30
Cromo Total	mg/kg	20
Cromo VI	mg/kg	2.5
Cianuro (libre)	mg/kg	0.25
Estaño	mg/kg	5
Flúor (total)	mg/kg	200
Mercurio	mg/kg	0.1
Molibdeno	mg/kg	2
Níquel	mg/kg	20
Plomo	mg/kg	25
Selenio	mg/kg	1
Vanadio	mg/kg	25
Zinc	mg/kg	60
Parámetros Orgánicos		
Benceno	mg/kg	0.05
Clorobenceno	mg/kg	0.1
Etilbenceno	mg/kg	0.1
Estireno	mg/kg	0.1
Tolueno	mg/kg	0.1
Xileno	mg/kg	0.1
PCBs	mg/kg	0.1
Clorinados Alifáticos (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorobencenos (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hexaclorobenceno	mg/kg	0.1
Hexaclorociclohexano	mg/kg	0.01
Fenólicos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) cada tipo	mg/kg	0.1

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA

Ilustración 1. Preparación de agar K



Ilustración 2. Preparación de medios de cultivo



Ilustración 3. Esterilización de materiales



Ilustración 4 Llenado de cajas Petri



Ilustración 5. Agar para estudios



Ilustración 6. Recolección de muestra



Ilustración 7. Tamizaje luego del triturado



Ilustración 8. Maceración por 24 horas



Ilustración 9. Materiales necesarios para el extracto acuoso



Ilustración 10. Ensayo de mortalidad

