



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**SOBREVIVENCIA DEL NEMATODO C. ELGANS EXPUESTO AL AGUA  
DEL RIO CALERA AFECTADO POR LA ACTIVIDAD MINERA EN EL  
CANTÓN PORTOVELO**

**BRAVO RAMON PATRICIO FABIAN  
INGENIERO QUÍMICO**

**MADRID CELI JORGE ENRIQUE  
INGENIERO QUÍMICO**

**MACHALA  
2020**



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**SOBREVIVENCIA DEL NEMATODO C. ELGANS EXPUESTO AL  
AGUA DEL RIO CALERA AFECTADO POR LA ACTIVIDAD  
MINERA EN EL CANTÓN PORTOVELO**

**BRAVO RAMON PATRICIO FABIAN  
INGENIERO QUÍMICO**

**MADRID CELI JORGE ENRIQUE  
INGENIERO QUÍMICO**

**MACHALA  
2020**



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

SOBREVIVENCIA DEL NEMATODO *C. ELGANS* EXPUESTO AL AGUA DEL RÍO  
CALERA AFECTADO POR LA ACTIVIDAD MINERA EN EL CANTÓN  
PORTOVELO

BRAVO RAMON PATRICIO FABIAN  
INGENIERO QUÍMICO

MADRID CELI JORGE ENRIQUE  
INGENIERO QUÍMICO

GONZALEZ CARRASCO VICTOR HUGO

MACHALA, 18 DE DICIEMBRE DE 2020

MACHALA  
2020

# Tesis

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE  
INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

---

## FUENTES PRIMARIAS

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 15 words

Excluir bibliografía

Activo

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

Los que suscriben, BRAVO RAMON PATRICIO FABIAN y MADRID CELI JORGE ENRIQUE, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado SOBREVIVENCIA DEL NEMATODO C. ELGANS EXPUESTO AL AGUA DEL RIO CALERA AFECTADO POR LA ACTIVIDAD MINERA EN EL 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.

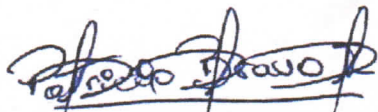
Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

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.

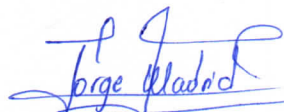
Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

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, 18 de diciembre de 2020



BRAVO RAMON PATRICIO FABIAN  
0704850841



MADRID CELI JORGE ENRIQUE  
0707036109

## DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a Dios Padre que está en los cielos por su divina misericordia, fuerza y bondad que me dio para terminar un objetivo de vida. A mis padres por su confianza y apoyo condicional para poder superarme como ser humano inculcándome valores para lograr ser un profesional correcto.

*Yahvé es mi pastor*

*Yahvé es mi pastor; nada me faltará.*

*En lugares de delicados pastos me hará descansar;*

*Junto a aguas de reposo me pastoreará.*

*Confortará mi alma;*

*Me guiará por sendas de justicia por amor de su nombre.*

*Aunque ande en valle de sombra de muerte,*

*No temeré mal alguno, porque tú estarás conmigo;*

*Tu vara y tu cayado me infundirán aliento.*

*Salmos 23:1-4*

**- Patricio Fabián Bravo Ramón -**

## AGRADECIMIENTO

Mi trabajo de titulación lo agradezco a Dios por la oportunidad de vida que día a día me lo supo dar y poderme nutrir de conocimientos en el transcurso de los estudios universitarios, formando habilidades únicas como profesional. A mis padres por apoyarme en todo el transcurso académico brindándome una oportunidad para surgirme con humildad y respeto hacia los demás.

### *Excelencias de la ley de Dios*

*Bienaventurados los perfectos de camino,  
Los que andan en la ley de Dios*

;

*Bienaventurados los que guardan sus testimonios,  
Y con todo el corazón le buscan;*

*Pues no hacen iniquidad  
Los que andan en sus caminos.*

***Salmos 119: 1-3.***

**- Patricio Fabián Bravo Ramón -**

## **DEDICATORIA**

Mi trabajo de titulación lo dedico primeramente a Dios, el que me ha dado fortaleza, ha sido mi guía, y con su mano de fidelidad y amor ha estado conmigo hasta el día de hoy para continuar; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mis padres que con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por apoyarme cuando más lo he necesitado, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.

A mi familia que por medio de sus consejos y apoyo incondicional he logrado superarme y mejorar día a día y de esa manera lograr alcanzar las metas y objetivos propuestos para mi formación profesional.

**-Jorge Enrique Madrid Celi -**



## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por guiar mi camino y por permitirme concluir con mi objetivo. A mis padres y toda mi familia quienes son mi motor y mi mayor inspiración, que, a través de su amor, paciencia, buenos valores, ayudan a trazar mi camino.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a mi colega con quien desarrollamos el tema de investigación y al Dr. Víctor Hugo González, principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

**-Jorge Enrique Madrid Celi -**

## RESUMEN

El cantón Portovelo de la Provincia del Oro es la zona aurífera más importante del Ecuador. La explotación de oro en esta zona, inició en el siglo XIX y desde entonces, esta actividad ha generado daños al ecosistema y la salud humana debido a la remoción y utilización de material contaminantes de alta toxicidad que, por falta de protocolos eficientes en la disposición final de desechos, terminan acumulándose en las cuencas hidrográficas cercanas, desencadenando consecuencias adversas debido a la bioacumulación de estos metales pesados en la biota. De hecho, estudios preliminares han demostrado elevadas concentraciones de algunos metales pesados no esenciales (Hg, Pb, As, Mg, Zn, Cd), en los cantones Zaruma y Portovelo de la provincia de El Oro desde el nacimiento de los ríos Calera, Amarillo y Pindo, a lo largo de la cuenca, hasta llegar al río Puyango, donde se registran los valores más bajos de estos elementos.

El objetivo de esta investigación fue determinar la toxicidad de los metales pesados presentes en aguas del río Calera, usando el nematodo *Caenorhabditis elegans* como bioindicador toxicológico mediante ensayo mortalidad *in vitro*.

La concentración de metales pesados se determinó a partir de 4 muestras de agua a lo largo del río Calera, una muestra a la salida de la planta procesadora de oro antes de desembocar al río, y una muestra de sedimento del río. Para la cuantificación de los metales pesados - Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Arsénico (As), Cadmio (Cd)- se empleó la técnica de espectroscopia de absorción atómica.

Los resultados obtenidos revelaron que en ninguna de las estaciones muestreadas a lo largo del río las concentraciones de metales pesados fueron superiores a las establecidas en los estándares de calidad ambiental de referencia ( $Hg \leq 0,001$ ;  $Pb \leq 0,05$ ;  $As \leq 0,05$ ;  $Cd \leq 0,001$ ) mg/L. Sin embargo, en las muestras obtenidas en la salida de la planta procesadora, se evidenciaron concentraciones de (Hg 0,180; Pb 0,090; Cd 5,021; As 45,831) superiores a los límites permisibles de metales pesados, al igual que en la muestra de los sedimentos del río donde hubo una concentración de (Hg 0,121; Pb 5,630; Cd 4,254; As 78,142).

Para el ensayo de mortalidad se empleó el nematodo *Caenorhabditis elegans*, cepa N2, el cual fue expuesto durante lapsos de tiempo de 12, 24, 36 y 48 horas a diferentes diluciones (100%, 50%, 25%, 5% y 2,5%) de agua de las muestras obtenidas, para obtener la concentración letal media (CL50). La exposición de *C. elegans* a las muestras provenientes de las estaciones seleccionadas a lo largo del río Calera durante las 48 horas no produjeron mortalidad. Por el contrario, en la muestra de agua proveniente de la salida de la planta procesadora en la desembocadura al río y la de sedimentos, la mortalidad registrada del organismo bioindicador al cabo de los lapsos de tiempo probados fue  $\geq 50\%$  en todas las diluciones ensayadas, revelando que los vertidos de las aguas residuales al río representan un grave riesgo para el medio ambiente, biodiversidad y la salud humana.

Se hipotetiza que la ausencia de concentraciones peligrosas de metales pesados en el agua del río se podría explicar como consecuencia de la precipitación de los metales pesados al fondo del lecho del río.

**Palabras Claves:** *Caenorhabditis Elegans*, Toxicidad, Metales pesados, Bioindicador

## ABSTRACT

The Portovelo canton of the Gold Province is the most important gold-bearing zone in Ecuador. The exploitation of gold in this area began in the XIX century and since then, this activity has caused damage to the ecosystem and human health due to the removal and use of highly toxic polluting material that, due to lack of efficient protocols in the disposal final waste, they end up accumulating in nearby watersheds, triggering adverse consequences due to the bioaccumulation of these heavy metals in biota. In fact, preliminary studies have shown high concentrations of some non-essential heavy metals (Hg, Pb, As, Mg, Zn, Cd), in the Zaruma and Portovelo cantons of the El Oro province from the source of the Calera and Amarillo rivers. and Pindo, along the basin, until reaching the Puyango River, where the lowest values of these elements are recorded.

The objective of this research was to determine the toxicity of heavy metals present in the waters of the Calera River, using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a toxicological bioindicator by in vitro mortality assay.

The concentration of heavy metals was determined from 4 water samples along the Calera River, a sample at the outlet of the gold processing plant before flowing into the river, and a sediment sample from the river. For the quantification of heavy metals - Mercury (Hg), Lead (Pb), Arsenic (As), Cadmium (Cd) - the atomic absorption spectroscopy technique was used. The results obtained revealed that in none of the stations sampled along the river the concentrations of heavy metals were higher than those established in the reference environmental quality standards ( $Hg \leq 0.001$ ;  $Pb \leq 0.05$ ;  $As \leq 0.05$  ;  $Cd \leq 0.001$ ) mg / L. However, in the samples obtained at the output of the processing plant, concentrations of (Hg 0.180; Pb 0.090; Cd 5.021; As 45.831) were higher than the permissible limits of heavy metals, as in the sediment sample from the river where there was a concentration of (Hg 0.121; Pb 5.630; Cd 4.254; As 78.142).

For the mortality test, the nematode *Caenorhabditis elegans*, strain N2, was used, which was exposed for periods of time of 12, 24, 36 and 48 hours at different dilutions (100%, 50%, 25%, 5% and 2, 5%) of water from the samples obtained, to obtain the mean lethal concentration (LC50). Exposure of *C. elegans* to samples from selected stations along the Calera River during the 48 hours did not produce mortality. On the contrary, in the water

sample from the outlet of the processing plant at the mouth of the river and the sediment sample, the mortality recorded of the bioindicator organism after the time periods tested was  $\geq 50\%$  in all the dilutions tested. , revealing that wastewater discharges into the river represent a serious risk to the environment, biodiversity and human health.

It is hypothesized that the absence of dangerous concentrations of heavy metals in the river water could be explained as a consequence of the precipitation of heavy metals to the bottom of the river bed.

**Keywords:** Caenorhabditis Elegans, Toxicity, Heavy Metals, Bioindicator

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>14</b>
1.1.1 Problema General.....	14
1.1.2 Problema Específico.....	14
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 Objetivo General.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>1.3 HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>17</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
2.1 <i>Antecedentes de la minería en el cantón Portovelo</i> .....	17
2.2 <i>Localización del área de estudio</i> .....	17
2.2.1 Mapa del área de estudio.....	17
2.3 <i>Procesos mineros</i> .....	18
2.4 <i>Legislación minera en Ecuador</i> .....	18
2.5 <i>Residuos de Operaciones Minera</i> .....	19
2.5.1 Aguas ácidas de Minería.....	19
2.5.2 Sedimentos.....	19
2.6 <i>Metales pesados</i> .....	20
2.6.1 Arsénico (As).....	20
2.6.2 Cadmio (Cd).....	21
2.6.3 Mercurio (Hg).....	22
2.6.4 Plomo (Pb).....	23
2.7 <i>Espectrofotometría de absorción atómica</i> .....	24
2.8 <i>Nematodo C. elegans como organismo modelo</i> .....	24
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>26</b>

<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Tipo de Diseño de Investigación .....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Identificación de variables .....	26
3.1.2 Variable Independiente .....	26
3.1.3 Variable Dependiente .....	26
<b>3.2 Población y Muestra.....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Población.....	26
3.2.2 Muestra .....	26
<b>3.3. Materiales, Equipos y Reactivos .....</b>	<b>26</b>
3.3.1 Materiales de laboratorio .....	26
3.3.2 Equipos .....	27
3.3.3 Reactivos.....	27
3.3.4 Material Biológico.....	28
3.3.5 Otros materiales.....	28
<b>3.4 Técnicas y Métodos .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Recolección de muestras de agua .....	28
3.4.2 Recolección de muestras de sedimento .....	29
3.4.3 Equipo Analítico.....	29
3.4.4 Preparación de medios.....	30
3.4.5 Mantenimiento de la cepa N2 del nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	32
3.4.6 Sincronización .....	32
3.4.7 Ensayo de Mortalidad .....	33
<b><i>CAPITULO IV.....</i></b>	<b><i>34</i></b>
<b><i>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</i></b>	<b><i>34</i></b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b><i>CAPITULO VI.....</i></b>	<b><i>45</i></b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA.....</i></b>	<b><i>46</i></b>
<b><i>ANEXOS.....</i></b>	<b><i>53</i></b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Sitio de muestreo de cuenca hidrográfica Calera</i> <sup>11</sup> .....	17
Figura 2. <i>Ciclo de vida de Caenorhabditis Elegans</i> <sup>44</sup> .....	24
Figura 3. <i>Ensayos de cultivo de vida útil del nematodo C Elegans</i> <sup>54</sup> .....	33
Figura 4. Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (24h) de <i>C. Elegans</i> y concentraciones de la muestra de agua antes de llegar al río Calera.42	
Figura 5. Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (24h) de <i>C. Elegans</i> y concentraciones de la muestra de sedimento del río Calera .....	42

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Matriz de información de muestras de agua y sedimento .....	34
Cuadro 2. Mortalidad CL <sub>50</sub> de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestra de aguas del río Calera, sector el Pache. ....	34
Cuadro 3 Mortalidad CL <sub>50</sub> de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestra de aguas del río Calera, sector el Pache. ....	36
Cuadro 4. Mortalidad CL <sub>50</sub> de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestra de aguas del río Calera, sector el Pache. ....	37
Cuadro 5. Mortalidad CL <sub>50</sub> de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestra de aguas del río Calera, sector el Pache. ....	38
Cuadro 6. Mortalidad CL <sub>50</sub> de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestra de aguas antes de llegar al río Calera, sector el Pache. ....	39
Cuadro 7. Mortalidad CL <sub>50</sub> de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestra de sedimentos del río Calera, sector el Pache .....	40
Cuadro 8. Valores del CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua antes de llegar al río Calera “Planta procesadora” .....	41
Cuadro 9. Valores del CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% para la muestra de sedimento del río Calera. ....	42



## ÍNDICE DE ILUSTRACIÓN

Ilustración 1. Reactivos para Agar K.....	53
Ilustración 2. Preparación de Agar K.....	53
Ilustración 3 Reactivos para E. Coli OP50.....	53
Ilustración 4. Preparación y traspaso de E. Coli OP50.....	54
Ilustración 5. Reactivos para medio K.....	54
Ilustración 6. Reactivos para solución Bleatch.....	54
Ilustración 7. Esterilización de materiales.....	55
Ilustración 8. Toma de muestra de agua 1. Sector el Pache -rio Calera.....	55
Ilustración 9 Toma de muestra de agua 2. Sector el Pache -rio Calera.....	55
Ilustración 10. Toma de muestra de agua 3. Sector el Pache -rio Calera.....	56
Ilustración 11. Toma de muestra de agua 4. Sector el Pache -rio Calera.....	56
Ilustración 12. Medición de temperatura y oxígeno disuelto in situ.....	56
Ilustración 13. Análisis de metales espectrofotometría de absorción atómica por flama de acetileno de marca Perquin El mer 300.....	56
Ilustración 1. Mantenimiento del nematodo <i>C. elegans</i> .....	59
Ilustración 2. Traspaso de los nematodos a los pocillos.....	59
Ilustración 3. Secado y tamizado de muestra de sedimentos.....	60
Ilustración 4. Obtención de extracto líquido de sedimento.....	60
Ilustración 5. Análisis de metales pesados en las muestras de agua del río Calera realizado en el laboratorio Lab-Metalor.....	61
Ilustración 6. Análisis de metales pesados en la muestra de agua residual de una planta procesadora de oro realizados en el laboratorio Lab-Metalor.....	62
Ilustración 7. Análisis de metales pesados en la muestra de extracto de sedimentos del río Calera realizado en el laboratorio Lab-Metalor.....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1. Procedimiento para la preparación de medio K.....</u>	30
<u>Tabla 2. Procedimiento para la preparación de Agar K.....</u>	30
<u>Tabla 3. Procedimiento para la preparación de Agar K.....</u>	31
<u>Tabla 4 Procedimiento para la preparación para 50ml de solución blach.....</u>	31

## INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados es un problema mundial debido a los riesgos para la salud, asociados con la contaminación por metales. Aunque muchos metales son esenciales para la vida, pueden ser dañinos para el hombre, los animales, las plantas y los microorganismos a niveles tóxicos. La presencia de metales pesados en el agua se atribuye principalmente a la meteorización natural del material parental rico en metales y a actividades antropogénicas como las actividades industriales, mineras y agrícolas<sup>1</sup>.

En Ecuador la minería es uno de los principales ingresos económicos que genera rentabilidad, la misma que se realiza de manera artesanal con el uso desproporcionado de sustancias químicas, lo cual genera un desequilibrio al ecosistema y la salud humana, ya que estos metales en su gran mayoría presentan características específicas de bioacumulación y biodisponibilidad<sup>2</sup>.

En la actualidad la Provincia de El Oro, Portovelo es una de las zonas auríferas más afectadas por la extracción desmedida de material precioso y la cual ha acarreado muchas dificultades en la biota. El crecimiento en la minería es la principal fuente de metales pesados que introducen dichos contaminantes en diferentes segmentos del medio ambiente, incluidos el aire, el agua, el suelo y la biosfera. Los metales pesados como Arsénico (As), Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y Mercurio (Hg) son los principales contaminantes de los afluentes de agua y sedimentos debido a su naturaleza tóxica, no biodegradable y persistente. Los peces y vegetales absorben fácilmente los metales pesados debido a su alta solubilidad en los ambientes acuáticos. Por tanto, pueden acumularse en el cuerpo humano a través de la cadena alimentaria<sup>(1)(3)</sup>.

La contaminación presente en el río Calera representa un riesgo ambiental, con el uso del organismo modelo *Caenorhabditis Elegans*, que por sus características fisiológicas, genéticas y su tiempo de vida corto es el indicado para este tipo de estudios, además de su reproducción eficiente hace que sea de fácil mantenimiento en el laboratorio con el propósito de obtener resultados con eficacia y a corto tiempo<sup>4</sup>. La utilización del nematodo nos permitirá evaluar la toxicidad CL50 expuesto al agua y sedimento del río Calera afectado por la actividad minera en el cantón Portovelo.

# CAPÍTULO I

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad minera en el cantón Portovelo establece un problema para el medio ambiente, debido al proceso de obtención de metales preciosos. La calidad de las aguas de los ríos se ha visto afectada por la minería a pequeña y mediana escala, debido a las constantes descargas de relaves mineros que contienen altas concentraciones de metales pesados. La exposición del nematodo *C. elegans* a aguas y sedimentos del río Calera, nos permitirá evaluar el grado toxicológico por medio de concentración letal media CL50. Por lo tanto, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

### 1.1.1 Problema General

¿Se verá afectado el nematodo *Caenorhabditis Elegans* al ser expuesto en agua y sedimentos? De ser así, ¿Cuál es la concentración letal media CL50 en *Caenorhabditis Elegans* en agua y sedimento afectado por la contaminación minera?

### 1.1.2 Problema Específico

¿El agua y sedimentos del río Calera contienen niveles de metales pesados en concentraciones que presentan un riesgo de contaminación importante?

¿Cuál es la concentración letal media CL<sub>50</sub> presentes en las aguas y sedimentos del río Calera del cantón Portovelo?

¿La mortalidad CL<sub>50</sub> del nematodo se ve más afectada en el sedimento que en el agua del río Calera?

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

Evaluar la toxicidad CL50 en el nematodo *Caenorhabditis Elegans* expuesto al agua y sedimento del río Calera afectado por la actividad minera en el cantón Portovelo.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

Cuantificar la presencia de metales pesados (Hg, Pb, Cd, As) en las aguas y sedimento del río Calera en el cantón Portovelo.

Determinar la concentración letal media (Cl<sub>50</sub>) del agua antes del río Calera, utilizando el nematodo *Caenorhabditis Elegans* mediante bioensayos de toxicidad in vitro.

Determinar la concentración letal media (Cl<sub>50</sub>) en el sedimento del río Calera, utilizando el nematodo *Caenorhabditis Elegans* mediante bioensayos de toxicidad in vitro.

## **1.3 HIPÓTESIS**

Existe concentraciones de metales pesados Mercurio, Plomo, Cadmio y Arsénico en aguas y sedimentos del río Calera, que causan efectos toxicológicos en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

## 1.4 JUSTIFICACIÓN

En Ecuador la minería es uno de los principales factores económicos que generan ingresos, estas actividades se han venido realizando desde la época precolombina hasta la actualidad en la parte alta de la provincia de El Oro cantón Portovelo, aportando con fuentes de trabajo directa e indirecta para sus habitantes<sup>5</sup>. Las practicas mineras en el cantón han venido en auge con el desarrollo industrial, por lo tanto la minería ilegal ha aumentado paulatinamente utilizando recursos naturales y humanos para realizar su producción<sup>6</sup>.

Durante el proceso de extracción de metales preciosos, se realizan métodos de encapsulación del elemento generando lixiviados con cianuro y amalgamación con mercurio. Estos métodos utilizados generan activos ambientales debido al mercurio y cianuro que libera otros metales pesados que normalmente está constituido por una mezcla de lixiviados, que al no ser tratados adecuadamente, estos representan un riesgo para el ser humano por su alto contenido toxicológico<sup>5</sup>.

La constitución del estado ecuatoriano es el encargado de proteger los recursos naturales, haciendo que se cumplan las normas ambientales de acuerdo a la ley del Ecuador. Sin embargo, las áreas de explotación mineras están contaminadas por la erosión de las betas y minería a cielo abierto, con un precario control por partes de las autoridades ambientales originando el desalojo de los habitantes de la zona<sup>7</sup>. Debido a la problemática recurrente de la contaminación por la actividad minera en el cantón Portovelo, esta investigación pretende evaluar la toxicidad CL50 en el nematodo *Caenorhabditis Elegans* expuesto al agua y sedimentos del río Calera afectado por la actividad minera.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la minería en el cantón Portovelo

La explotación minera en el Ecuador se remonta a la época precolombina, la cual ha sido un pilar fundamental en el desarrollo económico en los últimos años. Históricamente el Ecuador se ha basado en la pequeña minería y minera artesanal, las cuales producen la extracción de metales preciosos como: oro, plata, cobre, entre otros<sup>8</sup>.

La minería en el cantón Portovelo se dio a inicio en el siglo XIX con la compañía norteamericana SADCO (South American Development Company), quien se desvinculo de Portovelo y el Ecuador en 1950 cesando así sus actividades mineras<sup>89</sup>. Alrededor de 1951 se da origen a una nueva compañía con nombre CIMA (Compañía Industrial Minera Asociada) que laboro por aproximadamente 20 años. A finales del periodo de explotación de la Compañía Industrial, se generó una baja importante en su procesamiento, la que daría paso al crecimiento a la minería artesanal y pequeña minería, logrando así posesionar a Portovelo como el primer cantón minero del país<sup>9</sup>.

#### 2.2 Localización del área de estudio

El cantón Portovelo se encuentra ubicado en la parte alta de la Provincia de El Oro, al límite con la Provincia de Loja y los cantones Piñas y Zaruma respectivamente<sup>10</sup>.

##### 2.2.1 Mapa del área de estudio

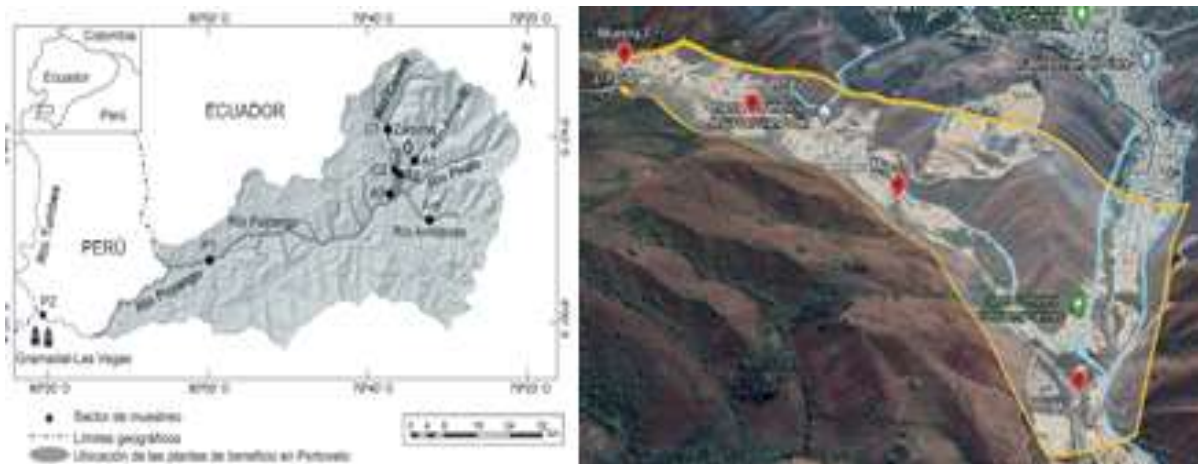


Figura 1. Sitio de muestreo de cuenca hidrográfica Calera<sup>11</sup>

### ***2.3 Procesos mineros***

En la explotación minera, requieren de talento humano y recursos naturales para realizar su producción y cumplir con la demanda, por lo tanto, esto provoca la expansión del territorio generando daños irreparables para el medio ambiente<sup>12</sup>. La mala práctica de extracción de minerales auríferos genera contaminación del aire, agua y suelos, desencadenando terrenos inactivos para la vida y afectaciones a la salud de los pobladores aledaños<sup>13</sup>.

La minería artesanal es generada por moradores nativos del lugar, produciendo ocupación de territorios inapropiados, el uso de maquinaria pesada, trabajadores eventuales y mal manejo de sus residuos, provocando el deterioro del ecosistema<sup>14</sup>. La falta de control por las autoridades reguladoras de minería, la contaminación ha aumentado por metales pesados de los suelos y fuentes hídricas, esto conlleva, a una bioacumulación de los seres bióticos que viven en estos sitio elevando el grado toxicológico para la población cercana a la minería<sup>15</sup>.

### ***2.4 Legislación minera en Ecuador***

En la constitución del Ecuador existen leyes para la protección y conservación del medio ambiente, así mismo, evitando que se violen los derechos de los trabajadores. La ley de conservación Ambiental, viene vigente desde los años 70 cuando empezó la gran minería y con el precario control ambiental<sup>16</sup>. Estas normativas siguen siendo vulneradas por el escaso incumplimiento y la disminución de la sanción para cierta minería que contaminan las fuentes hídricas sin importarle las consecuencias en la salud de la población, biodiversidad y medio ambiente.

El río Calera sufre constante descargas de efluentes al caudal por la industria minera, generando factores negativos para los habitantes cercanos al río, ocasionando enfermedades por el exceso de metales pesados (As, Hg, Cd, Pb), que están presentes en concentraciones elevadas en las aguas del afluente ubicado en el Cantón Portovelo, de la Provincia de EL Oro. Las autoridades gubernamentales de turno y la agencia de control minero, descuidan el daño ambiental provocado por la presencia de metales tóxicos en el caudal<sup>16</sup>.

En las provincias de Zamora Chinchipe, El Oro y Azuay, se encuentra ubicada bella rica una zona minera aurífera, donde la minería artesanal ha crecido paulatinamente generando trabajo ilegal, contaminación e ingresos para la supervivencia familiar<sup>17</sup>. Los cantones Portovelo y Zaruma la minería ilegal ha aumentado, provocando un cambio en la naturaleza,

afectaciones directas a la biodiversidad y bioacumulación de metales pesados en seres bióticos, además reduciendo la fuentes hídricas para el consumo humano aumentando las posibilidades de enfermedades y muerte celular<sup>18</sup>.

## ***2.5 Residuos de Operaciones Minera***

En Ecuador la minería ha dejado millones toneladas de desechos mineros a lo largo del tiempo, con importantes cantidades de metales pesados altamente tóxicos para la vida, debido al mal manejo de sus residuos y particularmente no concluyen el cierre técnico en el proceso de explotación<sup>19</sup>. Las operaciones mineras se realizan procesos de trituración, molienda, flotación, lixiviación, cianuración y purificación (Físico-Químico), esto genera grandes residuos minero-metalúrgicos y aguas ácidas que mayoritariamente son desechados en lugares inapropiados sin control técnico provocando pasivos ambientales<sup>20</sup>.

### ***2.5.1 Aguas ácidas de Minería***

Los drenajes ácidos de minería por lo general contienen exorbitantes concentraciones de metales pesados Cd, Hg, As, Pb, Al, Cu, Mg, Zn, Mn, Fe y SO<sub>4</sub>, siendo la causa principal de alteración y destrucción de los afluentes acuáticos. La contaminación de las cuencas hidrográficas por aguas ácidas se debe a características toxicológicas que poseen y producen daño a la calidad de vida del ecosistema<sup>21</sup>. Además, estas aguas ácidas, relaves y sustancias químicas como el cianuro, son almacenadas en bolsas o piscinas para un plan de mitigación (muy pocas industrias la aplican) antes de ser recirculadas y posteriormente ser desechadas a la fuente hídrica cercana. Este problema puede estar presente durante muchos años aun después de haber concluido con la explotación minera<sup>22</sup>.

### ***2.5.2 Sedimentos***

Las partículas finas o sedimentos son una de las variables importantes que se deben considerar para el manejo adecuado de la calidad del agua y los ecosistemas acuáticos. Los sedimentos son fuentes duraderas de sustancias tóxicas en las cuencas hidrográficas; es decir, los contaminantes como los metales pesados se transportan adheridos a los sedimentos. Estos pueden ser resultantes de actividades mineras o naturales, que generan un problema sobre la salud de las comunidades bentónicas y los ecosistemas acuáticos en general<sup>23</sup>.



## ***2.6 Metales pesados***

Se denomina metales pesados a los elementos que superan una densidad de  $6 \times 10^3 \text{ kg m}^3$ . En este grupo de elementos podremos encontrar Cadmio, Mercurio, Plomo, Arsénico, entre otros, los cuales son contaminantes que podemos encontrar en los diferentes procesos industriales como la minería. Las concentraciones que sobrepasan los límites permisibles de estos metales causan una inestabilidad en la biota, causando así problemas para el medio ecológico y por ende para la salud humana<sup>24</sup>.

### ***2.6.1 Arsénico (As)***

El arsénico (As) es un elemento químico que se encuentra en el grupo de los metaloides, está presente en abundancia en la corteza terrestre y se encuentra en más de 300 minerales con una concentración promedio de 5mg/L aproximadamente. Las actividades geogénicas y antropogénicas liberan compuestos de arsénico que varían en toxicidad, movilidad y biodisponibilidad. En la naturaleza al arsénico se lo encuentra en fuentes hídricas, aire y suelos usualmente como arsenitos y arseniatos<sup>25</sup>.

Desde la antigüedad el arsénico se viene aplicando en diferentes usos y esto con lleva a diversos problemas de contaminación más frecuentes en el mundo. El compuesto más tóxico es el arsenito con un número de 70% superior a cualquier compuesto metilados y el arsenato con un 10% más tóxico. La obtención de sustancias compuestas de arsénico se origina con mayor frecuencia en la actividad industrial minero-metalúrgico y agroindustria como herbicidas, combustibles fósiles, pesticidas, entre otros, hay al menos 40 países en el mundo con concentraciones de arsénico en afluentes son superior a  $10 \mu\text{g} / \text{L}$ <sup>26</sup>.

#### ***2.6.1.3 Toxicología del Arsénico***

El arsénico es uno de los venenos más notorios desde la antigüedad. Los humanos están expuestos al arsénico predominantemente a través del agua potable, el aire, la comida, ocupación y otras fuentes ambientales. Según Islam Khairul 2017, “la magnitud de contaminación del arsénico será el mayor desastre ambiental en la historia de la humanidad e incluso más serios que los de Chernobyl, Ucrania en 1986 y Bhopal, India en 1984”. Desde años atrás se han evidenciado intoxicación crónica por arsénico en las personas al entrar en contacto con agua contaminada, ocasionando irritaciones en la piel, enfermedades queratosis y cáncer a la piel<sup>27</sup>.

### 2.6.2 Cadmio (Cd)

El cadmio (Cd), descubierto por primera vez como una impureza del carbonato de zinc, es un elemento del grupo IIB y se caracteriza como un metal pesado. Es un elemento raro con una abundancia de 0,15 mg/kg en la corteza terrestre y una abundancia de  $1,1 \times 10^{-4}$  mg/L en el mar. El Cd es relativamente inestable y, por lo tanto, suele estar presente en la naturaleza como compuestos con sulfuros de zinc<sup>28</sup>. La mayor parte del Cd se usa para la producción de baterías (83%), mientras que el resto se usa para aleaciones, recubrimientos, enchapado y estabilizador para plásticos. Debido a su amplio uso en productos comerciales y actividades antropogénicas, los niveles de Cadmio han aumentado en el ambiente; por lo tanto, la necesidad de comprender las rutas de exposición y la toxicidad es de gran importancia<sup>28,29</sup>.

#### 2.6.2.2 Cadmio en el agua

Grandes cantidades de metales tóxicos se han descargado al medio ambiente a través de efluentes industriales y escorias de fundición, debido a procesos y métodos de tratamientos ineficientes. Especialmente el Cadmio en los residuos de procesos minero-metalúrgicos, se puede volver a migrar al agua superficial o subterránea por el clima y la lluvia en condiciones naturales o el transporte humano, y finalmente enriquecido en el sedimento<sup>28</sup>. Las intensas actividades mineras a lo largo de la orilla de los ríos han aumentado considerablemente las concentraciones de Cadmio en el sistema fluvial. Actualmente las concentraciones de metales pesados en el agua de los ríos exceden los valores permisibles, acarreado grandes dificultades para la biota<sup>30</sup>.

#### 2.6.2.3 Toxicología del Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico que se acumula en los sistemas vivos. La exposición puede ocurrir de manera ocupacional o ambiental. La exposición ambiental puede ser el resultado de actividades antropogénicas o del tabaquismo. El Cadmio tiene una vida media prolongada y se acumula biológicamente en plantas, invertebrados y vertebrados<sup>29</sup>.

Los efectos tóxicos del Cadmio pueden provocar un desequilibrio de Zn, Mg y Cu en el cuerpo y la orina. La exposición elevada al Cd a menudo se correlaciona con varios problemas de salud como insuficiencia renal, trastornos óseos, trastornos neurológicos, anosmia, problemas del sistema de reproducción masculina e incluso cáncer. Las personas con ocupaciones asociadas al Cd (por ejemplo, mineros, fundidores, soldadores y

trabajadores de recuperación de baterías) tienen mayores probabilidades de contraer cáncer de próstata<sup>31</sup>.

### *2.6.3 Mercurio (Hg)*

El mercurio es un metal pesado que se presenta en diversas formas, como mercurio elemental, compuestos inorgánicos y orgánicos con diferentes niveles de toxicidad y vías de exposición. El mercurio (Hg) ocupa el tercer lugar entre los elementos más tóxicos para la salud humana por la Agencia del Gobierno de los Estados Unidos (EE. UU.), para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades.

Durante muchos años, el mercurio se utilizó en una amplia variedad de actividades humanas. Hoy en día, la exposición a este metal tanto de fuentes naturales como artificiales está aumentando significativamente en concentraciones que generan un problema para la biota y la salud humana<sup>32</sup>.

#### *2.6.3.1 Mercurio en el Medio Ambiente*

El mercurio (Hg) es un contaminante ambiental ubicuo al que están expuestos los seres humanos en diferentes cantidades y formas químicas. Las tres formas principales de Hg que son motivo de preocupación para las poblaciones humanas no expuestas laboralmente son el metilmercurio, el vapor de mercurio y el etilmercurio<sup>33</sup>. Además, dado que los compuestos de Hg todavía se utilizan en muchas actividades humanas, la exposición ocupacional también es importante para la toxicidad inducida por metales. Es bien sabido que el vapor de mercurio se emplea en la minería de oro artesanal en pequeña escala, principalmente en los países subdesarrollados, y el número de humanos expuestos a este elemento sigue siendo elevado<sup>34</sup>.

#### *2.6.3.2 Mercurio en el agua*

Los ecosistemas acuáticos son un componente esencial del ciclo biogeoquímico mundial del mercurio, ya que el mercurio inorgánico puede convertirse en metilmercurio tóxico en estos entornos y las reemisiones de mercurio elemental rivalizan con las liberaciones antropógenas de mercurio a escala mundial<sup>35</sup>.

Generalmente producido a partir de fuentes biológicas por acción microbiana, el Metilmercurio ingresa a la cadena alimentaria acuática, donde experimenta un notable proceso de bioacumulación en los tejidos musculares de los peces, en particular de las especies depredadoras longevas, así como en los sistemas de agua dulce y marinos<sup>36</sup>.

### *2.6.3.3 Toxicología del Mercurio*

Para agravar una situación tan delicada, la toxicidad del Hg y los efectos asociados a la salud pueden variar notablemente a nivel individual, dependiendo no solo de su especiación química, concentraciones y tiempo de exposición, sino también de la susceptibilidad individual a los peligros del Hg<sup>35</sup>. En consecuencia, la exposición humana se produce por el consumo de alimentos derivados de animales acuáticos con metilmercurio bioacumulado, especialmente en poblaciones que viven cerca de océanos, lagos y ríos<sup>36</sup>. El cuadro clínico resultante se puede asociar de manera diferente a más de 250 síntomas, que involucran los sistemas neurológico, renal, respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular, hepático, reproductivo e inmunológico, con fetotoxicidad y genotoxicidad provocando muerte en humanos<sup>3632</sup>.

### *2.6.4 Plomo (Pb)*

Es un elemento químico que se ubica en el grupo IVA en la tabla periódica, con número atómico 82 y peso de 207.19<sup>37</sup>. El plomo es un metal pesado en su estado natural de la corteza terrestre con propiedades únicas como suavidad, alta maleabilidad, ductilidad, bajo punto de fusión que representa una gran amenaza para la salud humana en varios aspectos<sup>38</sup>.

#### *2.6.4.1 Plomo en el Medio Ambiente*

El plomo (Pb) es uno de los contaminantes ambientales más importantes y varios estudios han demostrado que el plomo es un desencadenante de problemas de salud<sup>38</sup>. El plomo es un metal persistente en todas las partes del medio ambiente, en el aire, el agua, el suelo y se deriva principalmente de una variedad de productos manufacturados como gasolina con plomo, pinturas, cerámicas, soldaduras, tuberías de agua, tintes para el cabello, cosméticos, aviones, equipos agrícolas, blindaje para máquinas de rayos x, entre otros; Además se considera una potente toxina ambiental de naturaleza no biodegradable<sup>39</sup>.

#### *2.6.4.3 Toxicología del Plomo*

En los seres humanos, las concentraciones más altas de plomo en sangre se han asociado con hipertensión, anomalías electrocardiográficas, enfermedad arterial periférica, hipertrofia ventricular izquierda y mortalidad por enfermedades cardiovasculares. La mayor parte de la carga corporal de Pb se encuentra en los tejidos mineralizados (huesos y dientes).<sup>39</sup> La dosis de plomo recomendada por la Organización Mixta de las Naciones Unidas para la Agricultura

y la Alimentación (FAO) / Comité de Expertos de la OMS en Aditivos Alimentarios (JECFA) para identificar la magnitud de efecto asociado con la exposición al plomo en agua potable es  $10\mu\text{g}/\text{l}$  y en el aire es  $0.5\mu\text{g} / \text{m}^3$ . La dosis umbral de plomo para mínima para los efectos sobre el cociente intelectual (CI) se deben a niveles de plomo en sangre tan bajos como  $5\mu\text{g} / \text{dl}$  ( $50\mu\text{g} / \text{l}$ )<sup>40</sup>.

### **2.7 Espectrofotometría de absorción atómica**

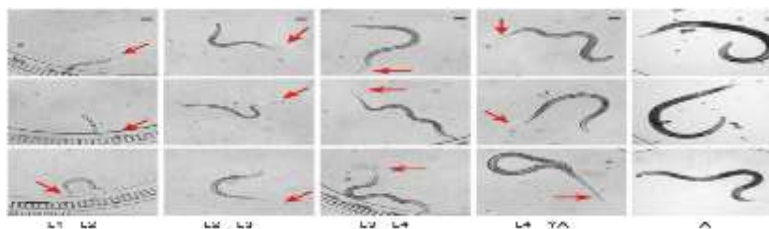
La técnica de espectrofotometría de absorción atómica explota transiciones cuantificadas, que son características de cada elemento individual y son detectables instrumentalmente en la mayoría de los casos<sup>41</sup>. Los métodos modernos de análisis cuantitativo se basan en la relación entre la respuesta del instrumento y la concentración de analito. Esta relación está fuertemente influenciada por los parámetros físicos específicos del analito y del tipo de técnica analítica utilizada, así como por las condiciones instrumentales y los efectos de la matriz<sup>42</sup>.

### **2.8 Nematodo *C. elegans* como organismo modelo**

*Caenorhabditis Elegans* es un nematodo que se alimenta de hongos y bacterias en el suelo y frutos en descomposición, con un poco más de 1 mm de largo es un pequeño nematodo que se puede mantener a bajo costo y manipular mediante técnicas in vitro estándar. A diferencia de las pruebas de toxicidad que utilizan cultivos celulares, las pruebas de toxicidad de *C. elegans* proporcionan datos de un animal completo con sistemas digestivo, reproductivo, endocrino, sensorial y neuromuscular intactos y metabólicamente activos<sup>43</sup>.

#### **2.8.1 Tiempo de Vida**

En el laboratorio, *C. elegans* con una capacidad reproductiva de aproximadamente 300 prole por adulto hermafrodita por autofertilización, y un ciclo de vida de aproximadamente 3 días, el nematodo *C. elegans* no es peligroso para los trabajadores de laboratorio y reproduce a temperaturas estimadas de 17 a 25 °C.



**Figura 2. Ciclo de vida de *Caenorhabditis Elegans***<sup>44</sup>

### 2.8.2 Ensayos toxicológicos

*Caenorhabditis elegans* es especialmente adecuado para estudios genéticos de desarrollo y comportamiento, muchos autores han demostrado que el nematodo *C. elegans*, es un organismo bioindicador valioso en la evaluación de riesgos ecológicos tanto en el medio acuático como en el suelo entre otros<sup>45</sup>. La publicación realizada “*Caenorhabditis elegans*” como modelo biológico para la evaluación toxicológica de aguas y sedimento”<sup>46</sup>, afirma la aplicación del uso del nematodo para medir el grado toxicológico en aguas y sedimentos, los métodos aplicados a nivel investigativo son mortalidad, crecimiento, reproducción, locomoción, estrés oxidativo, los cuales determinan el índice de contaminación<sup>47</sup>.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Tipo de Diseño de Investigación

Esta investigación se la desarrolló de manera cuasi experimental, ya que se implementaron técnicas y métodos planteados en investigaciones científicas antes realizadas.

##### 3.1.1 Identificación de variables

##### 3.1.2 Variable Independiente

- Concentración de metales pesados en agua del río Calera.

##### 3.1.3 Variable Dependiente

- Mortalidad del *C. elegans*
- Concentración letal media(CI<sub>50</sub>)

#### 3.2 Población y Muestra

##### 3.2.1 Población

Fuente fluvial Calera en lugares establecidos del cantón Portovelo, concerniente a la provincia del Oro.

##### 3.2.2 Muestra

Aguas del río, agua antes de llegar al río “planta procesadora, y sedimentos del río Calera perteneciente al cantón Portovelo.

#### 3.3. Materiales, Equipos y Reactivos

##### 3.3.1 Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación 50ml, 100ml
- Frascos ámbar 500ml
- Caja Petri

- Tubos falcón de 15 ml
- Micro puntas
- Mechero de alcohol
- Lámpara Ultravioleta
- Pipetas Pasteur
- Espátula
- Micro pipetas
- Erlenmeyer 500ml, 1000ml
- Tubos de ensayo
- Asa de platino
- Cooler

### *3.3.2 Equipos*

- Estereoscopio binocular modelo labomed. Ref.CZM6
- Estufa
- Autoclave marca YX-18 LM
- Centrifuga modelo Dynac
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perquin El mer 300.
- Incubadora
- Refrigerador modelo Electrolux

### *3.3.3 Reactivos*

- Agua Mili-Q
- Agua destilada
- Agar k
- Medio k
- Sustancia blanqueadora
- Hipoclorito de Sodio
- Alcohol industrial
- Alcohol potable



- Cloruro de Potasio
- Cloruro de Sodio
- Cloruro de Calcio
- Hidróxido de sodio
- Sulfato de Magnesio
- Peptona
- Colesterol

### *3.3.4 Material Biológico*

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

### *3.3.5 Otros materiales*

- Papel Periódico
- Papel Aluminio
- Cinta de papel
- Marcador
- Guantes de látex
- Mascarilla

## **3.4 Técnicas y Métodos**

### *3.4.1 Recolección de muestras de agua*

Las tomas de muestras de agua del río Calera fueron recolectadas a lo largo del caudal, delimitando los 4 puntos de muestreo de 0.75 Km de distancia de cada muestra respectivamente. “La toma de muestra de agua se realiza a una profundidad de 0.5 m y se coloca en un recipiente ámbar como lo indica la norma INEN 2169: 2013”<sup>48</sup>. Para su adecuado almacenamiento y transporte se adaptó un cooler previamente con hielo a una temperatura de -4 °C y en el laboratorio a una temperatura -10 °C.

### *3.4.2 Recolección de muestras de sedimento*

La muestra de sedimento fue recolectada en un punto a lo largo del río Calera, usando una pala, tres submuestras se obtuvieron de cada lugar para lograr aproximadamente 0.5 Kg de muestra compuesta a una profundidad de 0-10 cm. Para su transporte se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético en un cooler a 5°C, y almacenadas en el laboratorio a -10°C<sup>49</sup>.

El sedimento se disgregó con un mortero de porcelana y tamizados con malla metálica; 63 µm para obtención de la fracción fina y almacenados a -10°C. Para la obtención de extracto líquido, 15 g de muestra se mezclaron con 15 ml de agua destilada en vaso de precipitación de 50 ml (1:1) hasta una completa homogenización, las mezclas se almacenaron a 4°C por 24 h. Transcurrido el tiempo se mezcló la muestra para traspasar el contenido a tubos de extracción previamente preparados con micro malla metálica y lana de vidrio para pasar la menor cantidad de sedimentos, se repitió el procedimiento hasta obtener un volumen considerable de la muestra<sup>50</sup>.

### *3.4.3 Equipo Analítico*

Para medir la concentración de metales pesados existentes en la muestra de agua se utilizó un equipo de espectrofotometría de absorción atómica por flama de acetileno de marca Perquin El mer 300.

#### *3.4.3.1 Recta de calibrado*

Para realizar la calibración se utilizó concentraciones de patrones preparados y establecidos a partir de una determinada solución estándar para cada metal 1000mg/L<sup>51</sup>.

#### *3.4.3.2 Análisis de muestras*

Los analitos de interés de esta investigación fueron Arsénico(As), Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Mercurio (Hg). Las muestras se transportaron al laboratorio “Lab-Metalor” para su respectiva cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica por flama de acetileno, además se llevó acabo la técnica de calibración, análisis y lectura de cada uno de los metales de interés.

### 3.4.4 Preparación de medios

#### 3.4.4.1 Medio k

El medio K se caracteriza por ser una solución salina, que brinda óptimas condiciones para trabajar y desarrollar investigaciones con el nematodo *C. Elegans*<sup>52</sup>.

#### Preparación

Se usó un frasco de un tamaño mayor al volumen a preparar, según las cantidades que vamos a requerir tenemos el siguiente cuadro de referencia:

**Tabla 1.** Procedimiento para la preparación de medio K

Agua mili Q	KCl	NaCl
500ml	1.18gr	1.5gr
1000ml	2.36gr	3gr

Fuente: Autores

- Pesar la cantidad requerida de KCl y NaCl y colocar en el Erlenmeyer.
- Adicionar el Agua miliQ
- Tapar el Erlenmeyer con papel aluminio.
- Autoclavar por 1 hora aproximadamente.
- Dejar enfriar y colocar en nuestro recipiente y rotular.

#### 3.4.4.2 Agar K

El Agar k se denomina como el cultivo donde surge el crecimiento del nematodo y le da las condiciones adecuadas para su ciclo de vida.

#### Preparación

- Pesar las cantidades de referencia del cuadro según el volumen a trabajar.

**Tabla 2.** Procedimiento para la preparación de Agar K

Agua mili Q	KCl	NaCl	Peptona	Agar
500ml	1.18gr	1.5gr	1,25gr	8,5gr
1000ml	2.36gr	3gr	2,5gr	17gr

Fuente: Autores

- Colocar en un Erlenmeyer y homogenizar.
- Tapar el Erlenmeyer con papel aluminio mientras calentamos la mezcla.
- Autoclavar aproximadamente por 1 hora.
- Dejar enfriar la solución.

Agregamos

**Tabla 3.** Procedimiento para la preparación de Agar K

Agua mili Q	KCl	NaCl	Peptona	Agar
500ml	1.18gr	1.5gr	1,25gr	8,5gr
1000ml	2.36gr	3gr	2,5gr	17gr

Fuente: Autores

- Previamente esterilizamos las cajas petri a utilizar y el lugar de trabajo.
- Vertimos la solución en las cajas petri con un volumen aproximado de 20ml.
- Dejar enfriar y sellar las cajas petri con parafina para evitar contaminación de las placas por hongos o microorganismos.
- Rotular y guardar en refrigeración.

#### 3.4.4.3 Bleach Solution

La solución de blanqueo se utiliza para sincronizar cultivos de *C. elegans* en la primera etapa larvaria (L1). El método radica en que los nematodos son sensibles a la lejía, mientras que la cáscara del huevo protege a los embriones. Después del tratamiento con una solución alcalina de hipoclorito, los embriones se incuban en un medio líquido sin alimento, lo que permite la eclosión pero evita un mayor desarrollo<sup>53</sup>.

Preparación

**Tabla 4** Procedimiento para la preparación para 50ml de solución bleach.

Agua mili Q	HClO (5%)	NaOH
35ml	15ml	5 perlas

Fuente: Autores

- Mezclar y agitar con una varilla de vidrio hasta disolver el hidróxido de sodio.

- Rotular con fecha.

**Observación:** tomar en cuenta que la solución blach tiene una duración de tres días.

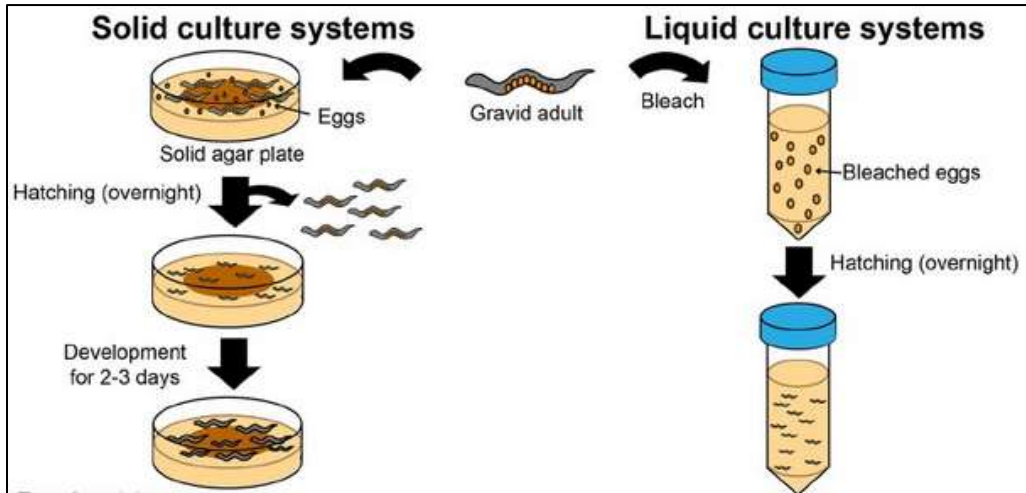
#### 3.4.5 Mantenimiento de la cepa N2 del nematodo *Caenorhabditis elegans*

Para llevar a cabo el mantenimiento, se procedió a preparar el medio de cultivo Agar K ya antes mencionado, el mismo que nos servirá para el crecimiento del nematodo. Agregar el alimento *Escherichiacoli* OP50 al medio de cultivo cada 48 horas aproximadamente 5 gotas<sup>54</sup>. Observamos las cajas petri que contengan la mayor cantidad de nematodos con ayuda del esteroscopio, con el medio K transferimos a un tubo falcón de 15ml para llevarlo a la centrifuga por 2 minutos a 2200rpm. Luego decantar y colocar por 5 minutos en hielo, removemos el sobrenadante y colocamos en una caja ya adecuada para el crecimiento del nematodo<sup>53</sup>.

#### 3.4.6 Sincronización

Para realizar la sincronización se verifico que las cajas petri tengan la suficiente cantidad de huevos del nematodo, con la ayuda de medio K traspasamos los nematodos y huevos a un tubo falcón de 15ml y centrifugamos por aproximadamente 2 minutos a 2200rpm. Dejamos reposar en hielo durante 5 minutos y eliminamos el sobrenadante hasta 2ml, adicionamos 10ml de solución bleach, agitamos suavemente durante 6 minutos y centrifugamos por 2 minutos a 2200rpm, rápidamente eliminamos el sobrenadante hasta 2ml, llenamos con medio k el tubo falcón hasta 15ml y agitamos, centrifugamos por 2 minutos a 2200rpm y dejamos reposar en hielo por 5 minutos, procedemos a eliminar el sobrenadante hasta 2ml, agregamos de 4 a 6 ml de medio K y centrifugamos por 2 minutos a 2200rpm, dejamos reposar en hielo y eliminamos el sobrenadante hasta 2ml, colocamos en las cajas de cultivo ya antes preparadas con alimento para los nematodos.

Esta técnica se realiza con el fin de eliminar los nematodos y dejarlos en un estado embrionico, de aquí acondicionamos los medios óptimos de crecimiento y desarrollo, hasta llegar a un estado de larva L4 y realizar los ensayos toxicológicos<sup>55</sup>.



**Figura 3. Ensayos de cultivo de vida útil del nematodo *C. Elegans***<sup>56</sup>

### 3.4.7 Ensayo de Mortalidad

Los ensayos de mortalidad se llevan a cabo con nematodos en estado larvario L4, los cuales se cultivan de las cajas Petri, realizamos las diluciones de la muestra acorde al tipo de estudio y con la ayuda de un asa de platino traspasamos los *C. Elegans* a las placas de polipropileno de 24 pocillos. Para una mayor confiabilidad en los resultados se realiza el ensayo toxicológico por triplicado y un blanco de Medio K. Con la ayuda de un microscopio observaremos acorde a los lapsos de tiempo ya establecidos daremos lectura cada 12, 24, 36 y 48 horas de los organismos vivos y muertos<sup>55</sup>.

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Cuadro 1.** Matriz de información de muestras de agua y sedimento

<b>Matriz de información de muestras de agua y sedimento</b>										
Muestra	Coordenadas UTM	Temperatura °C	Oxígeno Disuelto	pH	Fecha	Hora	Concentración de Metales (ppm)			
							Hg	As	Cd	Pb
<b>M1</b>	E 651579 N 9590545	25,1	115,5	7,02	01/06/20	09:00 am	<0,001	0,003	0,002	<0,001
<b>M2</b>	E 651850 N 9588950	25,1	115,5	7,40	01/06/20	09:30 am	<0,001	0,003	0,002	<0,001
<b>M3</b>	E 651555 N 9587813	30,3	112,3	7,30	01/06/20	10:00 am	<0,001	0,003	0,002	<0,001
<b>M4</b>	E 651765 N 9588542	31,6	94,4	7,26	01/06/20	10:45 am	<0,001	0,003	0,002	<0,001
<b>M5</b>	E 651555 N 9587813	27	135,5	9,78	11/08/20	10:00 am	0,180	45,831	5,021	0,090
<b>MS1</b>	E 651850 N 9588950	22,1	-	-	11/08/20	11:00 am	0,121	78,142	4,254	5,630

Fuente: Autores

En el cuadro 1, se detalla la información de las muestras de agua y sedimentos tomadas en la fuente fluvial Calera, donde no se halló concentraciones con porcentajes altos de metales pesados en las 4 primeras muestras, mientras que en la muestra 5 y 6 sus valores de concentración de metales pesados superan los límites permisibles de la normativa ambiental ecuatoriana.

**Cuadro 2.** Mortalidad CL<sub>50</sub> de *Caenorhabditis Elegans* en muestra de aguas del rio Calera, sector el Pache.

Ensayo de Mortalidad													
Muestra de agua del rio 1													
% Concentración	Expuestos	Tiempo de Exposición											
		12 h			24 h			36 h			48 h		
		M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT
100	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
100	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
100	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores



**Cuadro 3** Mortalidad CL<sub>50</sub> de *Caenorhabditis Elegans* en muestra de aguas del río Calera, sector el Pache.

<b>Ensayo de Mortalidad</b>													
<b>Muestra de agua del rio 2</b>													
<b>% Concentración</b>	<b>Expuestos</b>	<b>Tiempo de Exposición</b>											
		<b>12 h</b>			<b>24 h</b>			<b>36 h</b>			<b>48 h</b>		
		<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>
100	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
100	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
100	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

**Cuadro 4.** Mortalidad CL<sub>50</sub> de *Caenorhabditis Elegans* en muestra de aguas del río Calera, sector el Pache.

Ensayo de Mortalidad													
Muestra de agua del rio 3													
% Concentración	Expuestos	Tiempo de Exposición											
		12 h			24 h			36 h			48 h		
		M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT
100	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
100	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
100	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

**Cuadro 5.** Mortalidad CL<sub>50</sub> de *Caenorhabditis Elegans* en muestra de aguas del río Calera, sector el Pache.

<b>Ensayo de Mortalidad</b>													
<b>Muestra de agua del rio 4</b>													
<b>% Concentración</b>	<b>Expuestos</b>	<b>Tiempo de Exposición</b>											
		<b>12 h</b>			<b>24 h</b>			<b>36 h</b>			<b>48 h</b>		
		<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>%MT</b>
100	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
100	10	0	10		0	10		0	10		0	9	
100	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
25	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
5	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

**Cuadro 6.** Mortalidad CL<sub>50</sub> de *Caenorhabditis Elegans* en muestra de aguas antes de llegar al río Calera, sector el Pache.

Ensayo de Mortalidad													
Muestra antes de llegar al río "Planta procesadora"													
% Concentración	Expuestos	Tiempo de Exposición											
		12 h			24 h			36 h			48 h		
		M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT
100	10	7	3	66,66%	10	0	93,33%	10	0	100%	10	0	100%
100	10	7	3		9	1		10	0		10	0	
100	10	6	4		9	1		10	0		10	0	
50	10	1	9	6,66%	4	6	50%	8	2	80%	10	0	100%
50	10	0	10		6	4		7	3		10	0	
50	10	1	9		5	5		9	1		10	0	
25	10	0	10	3,33%	2	8	20%	4	6	36,66%	6	4	60%
25	10	1	9		3	7		4	6		7	3	
25	10	0	10		1	9		3	7		5	5	
5	10	0	10	3,33%	0	10	3,33%	3	7	23,33%	5	5	40%
5	10	0	10		1	9		2	8		4	6	
5	10	1	9		0	10		2	8		3	7	
Medio K	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

**Cuadro 7.** Mortalidad CL<sub>50</sub> de *Caenorhabditis Elegans* en muestra de sedimentos del río Calera, sector el Pache

Ensayo de Mortalidad													
Muestra de Sedimento 1													
% Concentración	Expuestos	Tiempo de Exposición											
		12 h			24 h			36 h			48 h		
		M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT
100	10	8	2	76.66%	8	2	80%	9	1	86.66%	10	0	93.33%
100	10	7	3		8	2		9	1		9	1	
100	10	8	2		8	2		8	2		9	1	
50	10	6	4	56.66%	7	3	63.33%	7	3	70%	8	2	80%
50	10	6	4		6	4		7	3		8	2	
50	10	5	5		6	4		7	3		8	2	
25	10	4	6	40%	4	6	43.33%	5	5	50%	6	4	60%
25	10	4	6		5	5		5	5		6	4	
25	10	4	6		4	6		5	5		6	4	
5	10	2	8	23.33%	3	7	33.33%	4	6	43.33%	5	5	50%
5	10	2	8		3	7		4	6		5	5	
5	10	3	7		4	6		5	5		5	5	
Medio K	10	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%	0	10	0%
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Medio K	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

Los ensayos de mortalidad del nematodo *Caenorhabditis elegans* referenciadas en los cuadros 1 al 6 fueron expuestos a las diferentes concentraciones de muestra de agua y sedimentos del río Calera en tiempos de 12, 24, 36 y 48 horas respectivamente.

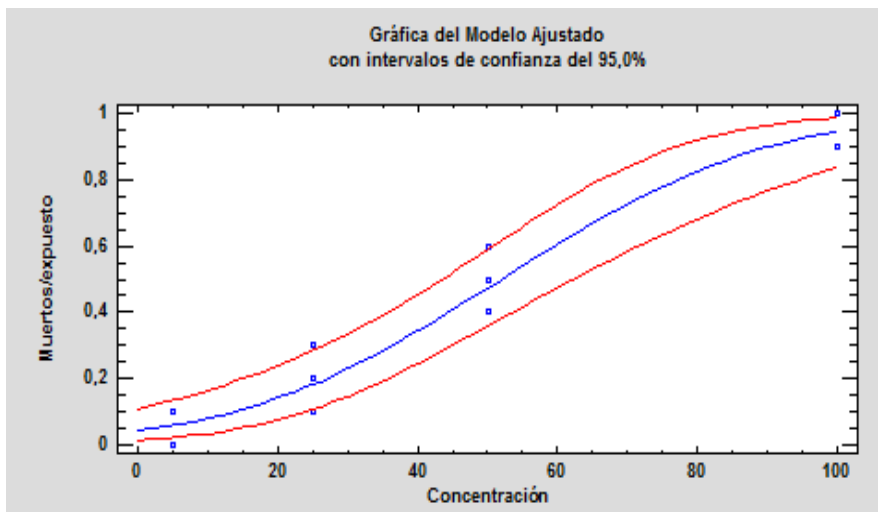
En los cuadros 1 al 4, la tasa de mortalidad de *C. elegans* es de 0%, observado durante el periodo de tiempo establecido, debido a baja concentración de metales pesados presentes en el agua, lo mismos que no están por encima de los límites permisibles establecidos por Tulsma VI anexo 1<sup>57</sup>. Para este propósito es indispensable analizar tanto el agua antes de llegar al río “planta procesadora” como los sedimentos, debido a que los metales tienden a precipitar en los sedimentos de los ríos aun cuando las concentraciones en agua sean bajas<sup>58</sup>.

El aumento en el caudal y los cambios en la dinámica fluvial de los cuerpos de agua superficial producto de la interacción de las corrientes de flujo y reflujo que lavan el sedimento pueden afectar drásticamente la configuración de su lecho. Muchos de los contaminantes que ingresan a un cuerpo de agua superficial, por vía natural o antropogénicas, quedan retenidos en los sedimentos que se depositan en el fondo del cauce, causando efectos tóxicos sobre los sistemas acuáticos<sup>59</sup>. En general, las trazas de metales pesados están asociadas con las partículas pequeñas de estos materiales. Esta tendencia es atribuida predominantemente a la adsorción, precipitación de los sedimentos y es dependiente de los parámetros granulométricos y la composición mineral<sup>60</sup>.

**Cuadro 8.** Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua antes de llegar al río Calera “Planta procesadora”.

<b>Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)</b>	<b>LC Inferior 95,0%</b>	<b>LC Superior 95,0%</b>
<b>52,083 %</b>	43,5961	62,305

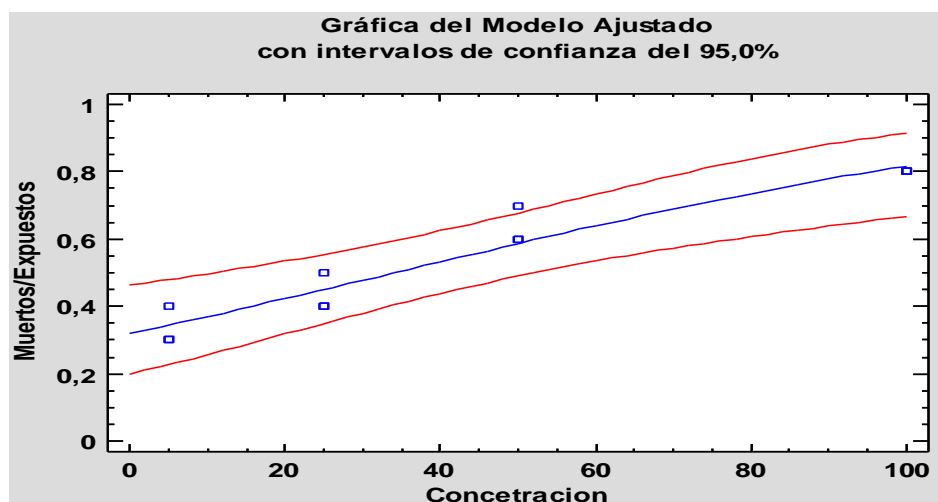
**Figura 4.** Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (24h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de agua antes de llegar al río Calera.



**Cuadro 9.** Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de sedimento del río Calera.

Concentración letal media CL50	LC Inferior 95,0%	LC Superior 95,0%
34,123 %	10,889	52,038

**Figura 5.** Gráfica de modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (24h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de sedimento del río Calera



En las gráficas de modelo ajustado se indican los valores correspondientes a CL50 con intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua antes de llegar al río “planta procesadora” la misma que se la evaluó en un tiempo de 24 h, de igual manera correspondiente al CL50 con intervalos de confianza al 95% para la muestra de sedimento la misma que se la evaluó en un tiempo de 24 h.

A partir de estos datos y graficas es posible proponer que el efecto tóxico demostrado en la muestra de agua antes de llegar al río “planta procesadora” presenta una mayor toxicidad en el nematodo, ya que logró una mortalidad CL50 en un tiempo de 24h, con una letalidad de 52,083%, a diferencia de la muestra de sedimentos, que en 24h se obtuvo una mortalidad de 34,143%.



## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES

1. Mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica se logró evaluar la presencia de Mercurio, Arsénico, Cadmio y Plomo en las muestras de aguas y sedimentos del río Calera sector el Pache, donde la muestra de agua antes de llegar al río “planta procesadora” y la muestra de sedimentos presentan un alto grado de contaminación por metales pesados, no así las muestras de agua tomadas a lo largo del río Calera.
2. La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) en la muestra de agua antes de llegar al río es de 52,083% en un tiempo de 24 horas, sin embargo, no fue posible determinar el  $CL_{50}$  en las muestras tomadas a lo largo del río debido a la ausencia de mortalidad de los nematodos *C. elegans*.
3. Mediante ensayos in vitro se logró determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) en el nematodo *C. elegans*, para la muestra de sedimento se obtuvo una mortalidad de 34,143% en un tiempo de 24 horas.

## CAPITULO VI

### 6. RECOMENDACIONES

- Implementar técnicas que logren una mayor eficiencia en el traspaso del nematodo, desde el medio de cultivo hasta los pocillos donde se llevara a cabo los ensayos toxicológicos.
- Por las bajas concentraciones de trazas de metales pesados en el agua del río, se recomienda profundizar la investigación en época normal de trabajo, las mismas que en el tiempo de la toma de muestra de la presente investigación no estaban en su capacidad máxima de operación por el motivo de pandemia.
- Recolectar en diferentes puntos muestras de sedimento, para poder corroborar los análisis realizados y lograr una comparación de la concentración de metales.
- Dados los niveles de contaminación en la muestra 5 de agua antes de llegar al río “planta procesadora” y la de sedimentos es recomendable establecer protocolos adecuados para retener los desechos tóxicos y así mitigar el impacto ambiental causado por trazas de metales pesados.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Abdu, N.; Abdullahi, A. A.; Abdulkadir, A. Heavy Metals and Soil Microbes. *Environ. Chem. Lett.* **2017**, *15* (1), 65–84. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0587-x>.
- (2) Lopez Bravo, M.; Santos Luna, J.; Quezada Abad, C.; Segura Osorio, M.; Perez Rodriguez, J. 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>.
- (3) González, A.; Santana, M.; González, M.; Pokrovsky, O. Bioadsorption of Heavy Metals. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (9), 1689–1699.
- (4) Bernard, I.; Okoduwa, S.; Idoko, G.; Akabuogu, E.; Adeyi, A.; Ejiogu, I. Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *J. Toxicol.* **2018**, 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/2568038>.
- (5) Larenas, D.; Fierro, V.; Fierro, C. Minería a Gran Escala: Una Nueva Industria Para Ecuador. *Polémika* **2017**, No. 12, 25.
- (6) Oviedo, R.; Moína, E.; Naranjo, J.; Barcos, M. Contaminación Por Metales Pesados En El Sur Del Ecuador Asociada a La Actividad Minera. *Lat. Am. J. Biotechnol.* **2017**, *5*, 1–7. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.5>.
- (7) Espinosa, C.; Maldonado, A.; Veliz, M. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL MÉTODO ÁCIDO CON LOS MÉTODOS TRADICIONALES USADOS EN LA RECUPERACIÓN DE ORO EN EL DISTRITO MINERO ZARUMA-PORTOVELO, Espol, 2014.
- (8) Almeida, M. D. Estudio de Caso Sobre La Gobernanza Del Sector Minero En El Ecuador. In *Actualidad Juridica Ambiental*; 2019; Vol. 1, p 117.
- (9) Rea Toapanta, A. R. Política Minera y Sostenibilidad Ambiental En Ecuador. *FIGEMPA Investig. y Desarro.* **2017**, *1* (2), 41–52. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i2.68>.

- (10) GAD Municipal de Portovelo. Planes de Desarrollo y Ordenamiento Territorial - Portovelo-El Oro. **2012**. <https://doi.org/10.1038/ncomms10959>.
- (11) Mora, A.; Jumbo-Flores, D.; González-Merizalde, M.; Bermeo-Flores, S. A. Niveles de Metales Pesados En Sedimentos de La Cuenca Del Río Puyango, Ecuador. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2016**, 32 (4), 385–397. <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.04.02>.
- (12) Latorre, Á. M. L. R.; Tovar, M. H. T. Explotación Minera y Sus Impactos Ambientales y En Salud. El Caso de Potosí En Bogotá. *Saúde em Debate* **2017**, 41 (112), 77–91. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201711207>.
- (13) Pantoja Timarán, F. H.; Pantoja Barrios, S. D. Problemas y Desafíos de La Minería de Oro Artesanal y En Pequeña Escala En Colombia. *Rev. Fac. Ciencias Económicas* **2016**, 24 (2), 147–161.
- (14) Carrizo, S.; Forget, M.; Denoël, M. Implantaciones Mineras y Trayectorias Territoriales. El Noroeste Argentino, Un Nuevo Centro Extractivo Mundial. *Rev. Estud. Soc.* **2016**, 2016 (55), 120–136. <https://doi.org/10.7440/res55.2016.08>.
- (15) Castro, L. Minería de Oro Artesanal y a Pequeña Escala En Timbiquí-Cauca : Una Aproximación Histórica a Sus Efectos Socioambientales Desde La Perspectiva de Los Actores Locales, 2011.
- (16) 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.
- (17) Levy, M. I. Megaminería, Agua y Territorio: Procesos de Des-Re-Territorialización Frente Al Concesionamiento de Zonas de Importancia Hídrica En La Parroquia El Chical, Provincia Del Carchi, Ecuador, 2019, Vol. 6. <https://doi.org/10.29166/siembra.v6i2.1697>.
- (18) Ley De Minería. *Ley de Minería Del República Del Ecuador*; 2018; p 65.
- (19) Güiza-Suárez, L. La Minería Manual En Colombia: Una Comparación Con América Latina / Manual Mining in Colombia: A Comparison with Other Countries in Latin

America. *Boletín Ciencias la Tierra* **2014**, No. 35, 37.

- (20) Rodríguez, R.; et. al. *Los Residuos Minero-Metalúrgicos En El Medio Ambiente*; 2006.
- (21) Aduvire, O. Dimensionado de Sistemas de Tratamiento de Aguas Acidas De Mina. *Rev. medio Ambient. y Min.* **2018**, 5, 11.
- (22) Machado Aráoz, H. Agua y Minería Transnacional . Desigualdades Hídricas e Implicaciones Biopolíticas. *Hábitat urbano Dimensiones y Perspect.* **2010**, 61–90.
- (23) Park, J.; Batalla, R. J.; Birgand, F.; Esteves, M.; Gentile, F.; Harrington, J. R.; Navratil, O.; López-Tarazón, J. A.; Vericat, D. Influences of Catchment and River Channel Characteristics on the Magnitude and Dynamics of Storage and Re-Suspension of Fine Sediments in River Beds. *Water (Switzerland)* **2019**, 11 (5). <https://doi.org/10.3390/w11050878>.
- (24) Alcalá, J.; Rodríguez, J.; María, V.; Hernández, A.; García, M.; Beltrán, A.; Rodríguez, H. Vegetación Bioindicadora de Metales Pesados En Un Sistema Semárido. *Rev. la Fac. Ciencias Agrar.* **2013**, 45 (1), 27–42.
- (25) Podgorski, J.; Berg, M. Global Threat of Arsenic in Groundwater. *Science (80-. )*. **2020**, 368 (6493), 845–850. <https://doi.org/10.1126/science.aba1510>.
- (26) Rangel, A.; Montañez, L.; Luévanos, M.; Balagurusamy, N. Impacto Del Arsénico En El Ambiente Y Su Transformación Por Microorganismos. *Terra Latinoam.* **2015**, 33 (2), 103–118.
- (27) Khairul, I.; Wang, Q. Q.; Jiang, Y. H.; Wang, C.; Naranmandura, H. Metabolism, Toxicity and Anticancer Activities of Arsenic Compounds. *Oncotarget* **2017**, 8 (14), 23905–23926. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14733>.
- (28) Chintaka, P.; Thenmoli, S.; Sivananthawerl, T.; Suranga, K.; Edirisinghe, U. Arsenic and Cadmium Contamination in Water, Sediments and Fish Is a Consequence of Paddy Cultivation: Evidence of River Pollution in Sri Lanka. *Achiev. Life Sci.* **2016**, 10 (2), 144–160. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.002>.
- (29) Zhang, H.; Reynolds, M. Cadmium Exposure in Living Organisms: A Short Review.

- Sci. Total Environ.* **2019**, *678*, 761–767.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395>.
- (30) Wang, J.; Jiang, Y.; Sun, J.; She, J.; Yin, M.; Fang, F.; Xiao, T.; Song, G.; Liu, J. Geochemical Transfer of Cadmium in River Sediments near a Lead-Zinc Smelter. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *196* (February), 110529.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110529>.
- (31) Zhao, X. M.; Yao, L. A.; Ma, Q. L.; Zhou, G. J.; Wang, L.; Fang, Q. L.; Xu, Z. C. Distribution and Ecological Risk Assessment of Cadmium in Water and Sediment in Longjiang River, China: Implication on Water Quality Management after Pollution Accident. *Chemosphere* **2018**, *194*, 107–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.127>.
- (32) Genchi, G.; Sinicropi, M. S.; Carocci, A.; Lauria, G.; Catalano, A. Mercury Exposure and Heart Diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14* (1), 1–13.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph14010074>.
- (33) Mahbub, K. R.; Kannan, K.; Naidu, R.; Andrews, S.; Megharaj, M. Mercury Toxicity to Terrestrial Biota. *Ecol. Indic.* **2017**, *74*, 451–462.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.12.004>.
- (34) Branco, V.; Caito, S.; Farina, M.; Teixeira da Rocha, J.; Aschner, M.; Carvalho, C. Biomarkers of Mercury Toxicity: Past, Present, and Future Trends. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* **2017**, *20* (3), 119–154.  
<https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1289834>.
- (35) Budnik, L.; Casteleyn, L. Mercury Pollution in Modern Times and Its Socio-Medical Consequences. *Sci. Total Environ.* **2019**, *654* (November 2018), 720–734.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.408>.
- (36) Esdaile, L. J.; Chalker, J. M. The Mercury Problem in Artisanal and Small-Scale Gold Mining. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (27), 6905–6916.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201704840>.
- (37) Nava, C.; Mendez, M. Efectos Neurotóxicos de Metales Pesados (Cadmio, Plomo,

Arsénico y Talio). *Arch Neurocién* **2011**, *16* (3), 140–147.

- (38) Andjelkovic, M.; Djordjevic, A. B.; Antonijevic, E.; Antonijevic, B.; Stanic, M.; Kotur-Stevuljevic, J.; Spasojevic-Kalimanovska, V.; Jovanovic, M.; Boricic, N.; Wallace, D.; Bulat, Z. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16* (2). <https://doi.org/10.3390/ijerph16020274>.
- (39) Boskabady, M.; Marefati, N.; Farkhondeh, T.; Shakeri, F.; Farshbaf, A.; Boskabady, M. H. The Effect of Environmental Lead Exposure on Human Health and the Contribution of Inflammatory Mechanisms, a Review. *Environ. Int.* **2018**, *120*, 404–420. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.013>.
- (40) Organización Mundial de la Salud (OMS). Intoxicación por plomo y salud <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health> (accessed Oct 21, 2020).
- (41) Donati, G. L.; Amais, R. S. Fundamentals and New Approaches to Calibration in Atomic Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2019**, *34* (12), 2353–2369. <https://doi.org/10.1039/c9ja00273a>.
- (42) Ferreira, S. L. C.; Bezerra, M. A.; Santos, A. S.; dos Santos, W. N. L.; Novaes, C. G.; de Oliveira, O. M. C.; Oliveira, M. L.; Garcia, R. L. Atomic Absorption Spectrometry – A Multi Element Technique. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *100*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.012>.
- (43) Hunt, P. R. The C. Elegans Model in Toxicity Testing. *J. Appl. Toxicol.* **2017**, *37* (1), 50–59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>.
- (44) Letizia, M. C.; Cornaglia, M.; Trouillon, R.; Sorrentino, V.; Mouchiroud, L.; Bou Sleiman, M. S.; Auwerx, J.; Gijs, M. A. M. Microfluidics-Enabled Phenotyping of a Whole Population of C. Elegans Worms over Their Embryonic and Post-Embryonic Development at Single-Organism Resolution. *Microsystems Nanoeng.* **2018**, *4* (1). <https://doi.org/10.1038/s41378-018-0003-8>.
- (45) Atakan, H. B.; Xiang, R.; Cornaglia, M.; Mouchiroud, L.; Katsyuba, E.; Auwerx, J.;

- Gijs, M. A. M. Automated Platform for Long-Term Culture and High-Content Phenotyping of Single *C. Elegans* Worms. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50920-8>.
- (46) Gonzalez, V.; Romero, C.; Dominguez, R.; Benitez, D. C. *Elegans* Como Organismo Modelo En Estudios de La Toxicidad Ambiental En Agua y Sedimentos. **2017**, 2, 196–203.
- (47) Peña, Z. M.; Vazquez, D. M. P.; Sánchez, M. G.; Olivo, L. A. S.; Tipacamú, G. A.; Carbajal, F. A. El Nematodo *Caenorhabditis Elegans* Como Modelo Para Evaluar El Potencial Antihelmíntico de Extractos de Plantas. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* **2017**, 8 (3), 279–289. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i3.4504>.
- (48) INEN. *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2169: 2013 Agua, Calidad de Agua, Muestreo Manejo y Conservación de Muestras.*; 2013.
- (49) Pesantes, F.; González, K. Evaluación Del Riesgo de Contaminación Por Metales Pesados ( Hg y Pb ) En Sedimentos Marinos Del Estero Huaylá , Puerto Bolívar , Ecuador Evaluation of the Risk of Contamination by Heavy Metals ( Hg and Pb ) in Marine Sediments of Estero Huaylá , Puerto B. *Rev. del Inst. Investig. FIGMMG-UNMSM* **2018**, 21 (41), 75–82.
- (50) Gonzalez Carrasco, V. H. Evaluación de La Toxicidad de Los Sedimentos Marinos a Través Del Uso Del Nematodo *Caenorhabditi Elegans* , Como Organismo Modelo En El Estero Huaylá , Parroquia Puerto Bolívar , Provincia de El Oro-Ecuador. **2018**.
- (51) 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.
- (52) Tejeda, L.; Olivero, J. *Perfil Toxicológico de Los Sedimentos Del Río Magdalena Usando Como Modelo Biológico Caenorhabditis Elegans*; 2016.
- (53) Porta-de-la-Riva, M.; Fontrodona, L.; Villanueva, A.; Cerón, J. Basic *Caenorhabditis Elegans* Methods: Synchronization and Observation. *J. Vis. Exp.* **2012**, No. 64, 1–9. <https://doi.org/10.3791/4019>.



- (54) Montalvão, S. C. L.; de Castro, M. T.; 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. *Cienc. Rural* **2018**, *48* (7). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170712>.
- (55) Parada, L. K.; Gualteros, A. V.; Sánchez, R. M. Phenotypic Characterization of the N2 Strain of *Caenorhabditis Elegans* as a Model in Neurodegenerative Diseases. *Nova* **2017**, *15* (28), 69–78.
- (56) Park, H.-E. H.; Jung, Y.; Lee, S.-J. V. Survival Assays Using *Caenorhabditis Elegans* *Caenorhabditis Elegans* Is an Important Model Organism With. *Mol. Cells* **2017**, *40* (2), 90–99.
- (57) Tulsma. *Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes : Recurso Agua*; 2011; pp 286–339.
- (58) Laino-Guanes, R. M.; Bello-Mendoza, R.; González-Espinosa, M.; Ramírez-Marcial, N.; Jiménez-Otárola, F.; Musálem-Castillejos, K. Concentración de Metales En Agua y Sedimentos de La Cuenca Alta Del Río Grijalva, Frontera México-Guatemala. *Tecnol. y Ciencias del Agua* **2015**, *6* (4), 61–74.
- (59) Dialnet EvaluacionDeMetalesPesadosEnLosSedimentosSuperfici 4835669 (2) | Atomic Absorption Spectroscopy | Chemistry <https://es.scribd.com/document/412543404/Dialnet-EvaluacionDeMetalesPesadosEnLosSedimentosSuperfici-4835669-2> (accessed Nov 12, 2020).
- (60) Rosas Rodríguez, H. CONTAMINACIÓN DE SEDIMENTOS DEL RIO ANOIA POR METALES PESADOS (BARCELONA - ESPAÑA). **2005**, *89* (5), 75–89.

## ANEXOS



**Ilustración 8.** Reactivos para Agar K



**Ilustración 9.** Preparación de Agar K.



**Ilustración 10** Reactivos para E. Coli OP50



**Ilustración 11.** Preparación y traspaso de E. Coli OP50



**Ilustración 12.** Reactivos para medio K



**Ilustración 13.** Reactivos para solución Bleach



**Ilustración 14.** Esterilización de materiales



**Ilustración 15.** Toma de muestra de agua 1. Sector el Pache -rio Calera.



**Ilustración 16** Toma de muestra de agua 2. Sector el Pache -rio Calera



**Ilustración 17.** Toma de muestra de agua 3. Sector el Pache -rio Calera



**Ilustración 18.** Toma de muestra de agua 4. Sector el Pache -rio Calera



**Ilustración 19.** Medición de temperatura y oxígeno disuelto in situ.



**Ilustración 20.** Análisis de metales espectrofotometría de absorción atómica por flama de acetileno de marca Perquin El mer 300.



**Ilustración 21.** . Mantenimiento del nematodo *C. elegans*.



**Ilustración 22.** Traspaso de los nematodos a los pocillos



**Ilustración 23.** Secado y tamizado de muestra de sedimentos



**Ilustración 24.** Obtención de extracto líquido de sedimento

**Ilustración 25.** Análisis de metales pesados en las muestras de agua del rio calera realizado en el laboratorio Lab-Metalor.



<b>Lugar:</b>	Zaruma, sector El Pache a 150 metros de la Gasolinera "Pioneros TAC" en la vía Pache – Portovelo	
<b>Fecha:</b>	Lunes, 01 de Junio de 2020	<b>No. Inf. 1958</b>
<b>Solicitado Por:</b>	Sr. Patricio Bravo	
<b>Institución Investigadora:</b>	UTMACH, Universidad Técnica de Machala	

**DATOS INFORMATIVOS:**

Elemento Analizado: Cadmio  
 Método: Absorción Atómica  
 Equipo utilizado: Perkin Elmer 300  
 Margen de error: ± 0,03 %

Longitud de onda de lámpara: 226,8  
 Energía de lámpara: 49  
 Absorbancia mínima: 0,286  
 Absorbancia máxima: 0,402

Elemento Analizado: Mercurio  
 Método: Absorción Atómica – Horno de Grafito  
 Equipo utilizado: Perkin Elmer 300  
 Margen de error: ± 0,03 %

Longitud de onda de lámpara: 268,4  
 Energía de lámpara: 63  
 Absorbancia mínima: 0,321  
 Absorbancia máxima: 0,907

Elemento Analizado: Plomo  
 Método: Absorción Atómica  
 Equipo utilizado: Perkin Elmer 300  
 Margen de error: ± 0,03 %

Longitud de onda de lámpara: 283,3  
 Energía de lámpara: 42  
 Absorbancia mínima: 0,012  
 Absorbancia máxima: 0,080

Elemento Analizado: Arsénico  
 Método: Absorción Atómica  
 Equipo utilizado: Perkin Elmer 300  
 Margen de error: ± 0,03 %

Longitud de onda de lámpara: 193,7  
 Energía de lámpara: 15  
 Absorbancia mínima: 0,028  
 Absorbancia máxima: 0,173

**REPORTE LAB-METALOR**

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	Cd(Total) mg/lit.	Hg(Total) mg/lit.	Pb(Total) mg/lit.	As(Total) mg/lit.
MUESTRA # 01 Solución	0,002	< 0,001	< 0,001	0,003



**Ilustración 26.** Análisis de metales pesados en la muestra de agua residual de una planta procesadora de oro realizados en el laboratorio Lab-Metalor.



Lugar:	Zaruma, sector El Pache a 150 metros de la Gasolinera "Pioneros TAC" en la vía Pache – Portovelo	No. Inf. 1982
Fecha:	Martes, 11 de Agosto de 2020	
Solicitado Por:	Sr. Patricio Bravo	
Institución Investigadora:	UTMACH, Universidad Técnica de Machala	

**DATOS INFORMATIVOS:**

Elemento Analizado: Cadmio	Longitud de onda de lámpara: 228,8
Método: Absorción Atómica	Energía de lámpara: 49
Equipo utilizado: Perkin Elmer 300	Absorbancia mínima: 0,286
Margen de error: ± 0,03 %	Absorbancia máxima: 0,402
Elemento Analizado: Mercurio	Longitud de onda de lámpara: 268,4
Método: Absorción Atómica – Horno de Grafito	Energía de lámpara: 63
Equipo utilizado: Perkin Elmer 300	Absorbancia mínima: 0,321
Margen de error: ± 0,03 %	Absorbancia máxima: 0,907
Elemento Analizado: Plomo	Longitud de onda de lámpara: 283,3
Método: Absorción Atómica	Energía de lámpara: 42
Equipo utilizado: Perkin Elmer 300	Absorbancia mínima: 0,012
Margen de error: ± 0,03 %	Absorbancia máxima: 0,080
Elemento Analizado: Arsénico	Longitud de onda de lámpara: 193,7
Método: Absorción Atómica	Energía de lámpara: 15
Equipo utilizado: Perkin Elmer 300	Absorbancia mínima: 0,028
Margen de error: ± 0,03 %	Absorbancia máxima: 0,173

**REPORTE LAB-METALOR**

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	Cd(Total) mg/lit.	Hg(Total) mg/lit.	Pb(Total) mg/lit.	As(Total) mg/lit.
MUESTRA # 01 Solución	5,021	0,180	0,090	45,831

**Ilustración 27.** Análisis de metales pesados en la muestra de extracto de sedimentos del río Calera realizado en el laboratorio Lab-Metalor.



<b>Lugar:</b>	Zaruma, sector El Pache a 150 metros de la Gasolinera "Pioneros TAC" en la vía Pache – Portovelo	<b>No. Inf.</b> 1983
<b>Fecha:</b>	Martes, 11 de Agosto de 2020	
<b>Solicitado Por:</b>	Sr. Patricio Bravo	
<b>Institución Investigadora:</b>	UTMACH, Universidad Técnica de Machala	

**DATOS INFORMATIVOS:**

**Elemento Analizado:** Cadmio  
**Método:** Absorción Atómica  
**Equipo utilizado:** Perkin Elmer 300  
**Margen de error:** ± 0,03 %

**Longitud de onda de lámpara:** 228,8  
**Energía de lámpara:** 49  
**Absorbancia mínima:** 0,286  
**Absorbancia máxima:** 0,402

**Elemento Analizado:** Mercurio  
**Método:** Absorción Atómica – Horno de Grafito  
**Equipo utilizado:** Perkin Elmer 300  
**Margen de error:** ± 0,03 %

**Longitud de onda de lámpara:** 268,4  
**Energía de lámpara:** 65  
**Absorbancia mínima:** 0,321  
**Absorbancia máxima:** 0,907

**Elemento Analizado:** Plomo  
**Método:** Absorción Atómica  
**Equipo utilizado:** Perkin Elmer 300  
**Margen de error:** ± 0,03 %

**Longitud de onda de lámpara:** 283,3  
**Energía de lámpara:** 42  
**Absorbancia mínima:** 0,012  
**Absorbancia máxima:** 0,080

**Elemento Analizado:** Arsénico  
**Método:** Absorción Atómica  
**Equipo utilizado:** Perkin Elmer 300  
**Margen de error:** ± 0,03 %

**Longitud de onda de lámpara:** 193,7  
**Energía de lámpara:** 15  
**Absorbancia mínima:** 0,028  
**Absorbancia máxima:** 0,173

**REPORTE LAB-METALOR**

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	Cd(Total) mg/lit	Hg(Total) mg/lit	Pb(Total) mg/lit	As(Total) mg/lit
MUESTRA #01 Solución	4,254	0,121	5,630	78,142

