



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

ENSAYO DE TOXICIDAD CL50 USANDO COMO BIOINDICADOR EL
NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS, EN AGUA DEL RÍO
PAUTE - CUENCA.

BELDUMA MEDINA JOE RENNY
INGENIERO QUÍMICO

ROMERO SAGAL FREDDY STIVEN
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

ENSAYO DE TOXICIDAD CL50 USANDO COMO
BIOINDICADOR EL NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS,
EN AGUA DEL RÍO PAUTE - CUENCA.

BELDUMA MEDINA JOE RENNY
INGENIERO QUÍMICO

ROMERO SAGAL FREDDY STIVEN
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

ENSAYO DE TOXICIDAD CL50 USANDO COMO BIOINDICADOR EL NEMATODO
CAENORHABDITIS ELEGANS, EN AGUA DEL RÍO PAUTE - CUENCA.

BELDUMA MEDINA JOE RENNY
INGENIERO QUÍMICO

ROMERO SAGAL FREDDY STIVEN
INGENIERO QUÍMICO

GONZALEZ CARRASCO VICTOR HUGO

MACHALA, 24 DE SEPTIEMBRE DE 2021

MACHALA
2021

ENSAYO DE TOXICIDAD CL50 USANDO COMO BIOINDICADOR EL NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS, EN AGUA DEL RÍO PAUTE – CUENCA.

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS

Trabajo del estudiante

1 %

2

Submitted to Universidad Politecnica Salesiana del Ecuador

Trabajo del estudiante

1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 20 words

Excluir bibliografía

Activo

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

Los que suscriben, BELDUMA MEDINA JOE RENNY y ROMERO SAGAL FREDDY STIVEN, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado ENSAYO DE TOXICIDAD CL50 USANDO COMO BIOINDICADOR EL NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS, EN AGUA DEL RÍO PAUTE - CUENCA., 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, 24 de septiembre de 2021



BELDUMA MEDINA JOE RENNY
0750674988



ROMERO SAGAL FREDDY STIVEN
0705455251

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a Dios Padre por otorgar fuerza y valor para sobrellevar los obstáculos que se me presentaron a lo largo de mi carrera universitaria.

Sobre todo, a mis padres y abuelos por su confianza, apoyo para poder instruirme, y sobre todo por enseñarme los valores necesarios para lograr ser un profesional honesto.

- Joe Renny Belduma Medina -

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la sabiduría que me otorgó para poder adquirir los conocimientos necesarios para formar habilidades como profesional, de esta manera poder desenvolverme en las distintas situaciones o circunstancias que me presentaba la vida.

A mis padres Edwin Belduma, Angélica Medina y mi abuelo Luis Belduma Belduma por ser mi pilar fundamental para apoyarme a pesar de las circunstancias siempre me brindaron amor, apoyo y comprensión durante toda mi etapa educativa, aquello ha sido muy importante para poder dirigirme con humildad y respeto hacia los demás.

Finalmente, pero no menos importante, mi sincero agradecimiento a mi colega el Dr. Víctor Hugo Gonzáles Carrasco, que fue quien colaboró durante todo el proceso con su conocimiento, y dirección, la cual permitió la realización de este trabajo de investigación.

- Joe Renny Belduma Medina -

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A mis padres por ser mis pilares fundamentales, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser su hijo, son los mejores padres.

En memoria de mi hermana por ser la inspiradora de mis propósitos y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

- Freddy Stiven Romero Sagal -

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo investigativo agradezco a Dios por ser mi guía y brindarme sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

Sin embargo, un reconocimiento especial mi Madre Olga Sagal y mi Padre Freddy Romero que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible. No tengo palabras para agradecerles las incontables veces que me brindaron su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, unas buenas, otras malas, otras locas. Gracias por darme la libertad de desenvolverme como ser humano

De igual manera, agradezco a mi tutor de Tesis Dr. Víctor Hugo Gonzales, que gracias a sus consejos y correcciones hoy puedo culminar este trabajo. A los profesores que me han visto crecer como persona, y gracias a sus conocimientos hoy puedo sentirme contento.

- Freddy Stiven Romero Sagal -

RESUMEN

El cantón Cuenca de la Provincia del Azuay es una de las zonas importantes de extracción de metales y curtido de cueros. La actividad de extracción de oro, plata y curtido de cueros inició en el siglo XX y desde allí estas actividades han causado daños al medio ambiente y por consiguiente a la salud humana, debido a la cantidad de sustancias químicas, orgánicas e inorgánicas que provocan una alta toxicidad en las aguas residuales de aquellas industrias que, por falta de buenas prácticas de manejo de desechos peligrosos y disposición final de los mismos, se han acumulado en diferentes cuencas hidrográficas aledañas. Aquello genera consecuencias porque estos metales como (Cromo, Plomo, Arsénico, Cadmio) tienden a contaminar el recurso vital, estudios realizados preliminarmente han demostrado que existen concentraciones de Cromo Hexavalente a lo largo del Río Paute, donde se han registrado valores por debajo de la normativa nacional.

Mediante ensayos de mortalidad *in vitro*, esta investigación tiene como objetivo determinar la toxicidad en aguas del río Paute posiblemente causada por el metal pesado Cromo Hexavalente, utilizando el nematodo *Caenorhabditis Elegans* como bioindicador toxicológico.

Para determinar la concentración de Cromo Hexavalente se procedió a analizar 3 muestras de agua que se tomaron a lo largo del Río Paute; la primera muestra al unirse el Río Tomebamba y el Río Yanuncay, una segunda muestra diagonal a una industria curtidora de cueros “Curtiembre Renaciente”, y una tercera muestra en la unión con el Río Milchiching. Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos como el potencial de hidrógeno (pH), color, temperatura y sólidos disueltos totales se empleó un Equipo Multiparámetros y para la determinación del metal pesado Cromo Hexavalente (Cr^{+6}) se empleó la técnica de espectrofotometría UV-Visible.

Al finalizar, con los resultados que se obtuvo se pudo evidenciar que a lo largo del río que existen concentraciones del metal pesado Cromo Hexavalente por debajo de los estándares de calidad ambiental que se utiliza como referencia ($Cr \leq 0.05$) mg/L. En las muestras uno, dos y tres se evidenciaron concentraciones ($M_1 = 0.017$; $M_2 = 0.020$; $M_3 = 0.018$) de Cromo Hexavalente respectivamente. Según la normativa nacional TULSMA Anexo 1 del Libro VI: Norma de calidad Ambiental y de descarga de

efluentes: Recurso Agua, Criterios de calidad para aguas destinadas al consumo humano y uso doméstico, previo a su potabilización¹⁴, se puede decir que las muestras de agua no contienen concentraciones superiores a los límites permisibles de dicho metal.

Para los ensayos de letalidad se empleó al nematodo *Caenorhabditis Elegans* (Cepa N2). Aquel fue expuesto durante lapsos de tiempo de 8, 24, 48 y 72 horas en diferentes diluciones (100%, 85%, 75% y 50%) de cada una de las tres muestras obtenidas. La muestra uno durante las 72 horas produjo una mortalidad del 50%, mientras que en las muestras dos y tres, que fueron seleccionadas en diferentes puntos a lo largo del Río Paute se pudo registrar una mortalidad mayor al 50% a largo plazo como lo indican algunos estudios realizados con otros bioindicadores de toxicidad.

Se hipotetiza que las industrias mencionadas anteriormente serían responsables de la contaminación del río debido a los químicos utilizados a lo largo del proceso de obtención y más que todo el mal manejo de las sustancias químicas, tratamiento y disposición final de desechos, se podría explicar como una de las consecuencias de la contaminación al efluente vital del Río Paute.

Palabras Clave: Curtiembre, *Caenorhabditis Elegans*, Bioindicador, Cromo Hexavalente, Espectrofotometría.

ABSTRACT

The Cuenca Canton of the Azuay Province is one of the important areas of metal extraction and leather tanning. The mining of gold, silver and leather tanning began in the twentieth century and from there these activities have caused damage to the environment and consequently to human health, due to the amount of chemicals, organic and inorganic wastes that cause high toxicity in the waste water of those industries that, due to the lack of good management practices for hazardous wastes and their final disposal, have accumulated in different surrounding watersheds. That generates consequences because these metals such as (Chromium, Lead, Arsenic, Cadmium) tend to contaminate the vital resource, studies conducted preliminarily have shown that there are concentrations of Hexavalent Chromium along the Paute River, along the basin, where values below national standards have been recorded.

Using in vitro mortality tests, this research aims to determine the toxicity in waters of the river Paute possibly caused by the heavy metal Chromium Hexavalent, using the nematode *Caenorhabditis Elegans* as a bio-toxicological indicator.

To determine the concentration of Hexavalent Chromium, we proceeded to analyze 3 water samples that were taken along the Paute River, the first sample when joining the Tomebamba River and the Yanuncay River, a second diagonal sample to a leather tanning industry "Rebirth Tannery", and a third sample at the junction with the Milchiching River. For the determination of physicochemical parameters such as hydrogen potential (pH), color, temperature and total dissolved solids, a Multiparameter Equipment was used and for the determination of the heavy metal Hexavalent Chromium (Cr (+6)) the UV-Visible spectrophotometry technique was used.

At the end, the results obtained showed that along the river at the point there are concentrations of the heavy metal Hexavalent Chromium below the environmental quality standards that is used as a reference ($Cr \leq 0.05$) mg/L. In samples 1, two and three concentrations ($M1 = 0.017$; $M2 = 0.020$; $M3 = 0.018$) of Hexavalent Chromium were observed respectively. According to the national regulations TULSMA Annex 1 of Book VI: Standard of Environmental Quality and discharge of effluents: Water Resource, Quality criteria for water intended for human consumption and domestic use, prior to its potabilization, it can be said that the water samples do not contain concentrations higher than the permissible limits of that metal.

The nematode *Caenorhabditis Elegans* (Strain N2) was used for lethality tests. It was exposed for 8, 24, 48 and 72 hours in different dilutions (100%, 85%, 75% and 50%) of each of the three samples obtained. Sample one during 72 hours produced a 50% mortality, while in samples two and three, which were selected at different points along the Paute River, mortality greater than 50% in the long term could be recorded, as indicated by some studies carried out with other bioindicators of toxicity.

It is hypothesized that the industries mentioned above would be responsible for the pollution of the river due to the chemicals used throughout the process of obtaining and more than all the mismanagement of chemicals, treatment and final disposal of wastes, could be explained as one of the consequences of pollution to the vital effluent of the Paute River.

Keywords: Tannery, *Caenorhabditis Elegans*, Bioindicator, Hexavalent Chromium, Spectrophotometry.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.1.1 Problema General	3
1.1.2 Problemas Específicos	3
1.2 ALCANCE	4
1.3 OBJETIVOS	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 HIPÓTESIS	4
1.5 JUSTIFICACIÓN	5
CAPÍTULO II	6
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Antecedentes del Impacto por la Contaminación de Aguas de Ríos.	6
2.1.1 Clases de contaminantes presentes en el agua.	6
2.2 Localización del área de estudio	6
2.3 Toma de Muestra	7
2.4 Industria de las Curtiembres	8
2.5 Industria Minera	8
2.6 Sustancias Contaminantes	9
2.6.1 Industria del curtiembre.	9
2.6.2 Industria Minera.	9

2.7	El Metal Pesado Cromo.	10
2.7.1	Efectos del Cromo en Seres Humanos y Animales.	10
2.7.2	Afectaciones del Cromo en la Salud	10
2.7.3	Efectos Ambientales del Cromo	11
2.7.4	Usos del Cromo Trivalente y Hexavalente.	11
2.8	Principales parámetros de las aguas residuales en las industrias.	11
2.8.1	Sólidos sedimentables:	12
2.8.2	Temperatura:	12
2.8.3	Potencial Hidrógeno (pH)	12
2.8.4	Sólidos suspendidos:	12
2.8.5	Nitratos:	12
2.8.6	Cromo hexavalente:	13
2.8.7	Mercurio	13
2.8.8	Arsénico	13
2.8.9	Plomo	13
2.8.10	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	14
2.8.11	Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	14
2.8.12	Grasas	14
2.8.13	Espectrofotometría UV-Visible	14
2.9	Nematodo 30	
2.9.1	Características Generales	14
2.9.2	Ciclo de vida.	15
2.9.3	Importancia del Nematodo 32	
2.10	Marco Legal	16
2.10.1	Constitución de la República del Ecuador	16
2.10.2	TULSMA: Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente	17

2.10.3	Ley De Gestión Ambiental	17
2.10.4	Ley Orgánica de Salud	17
2.10.5	Código Penal	18
CAPÍTULO III		19
3.	METODOLOGÍA	19
3.1	Tipo de Diseño de Investigación	19
3.2	Identificación de Variables	19
3.2.1	Variables independientes	19
3.2.2	Variables dependientes	19
3.3	Población y Muestra	19
3.3.1	Población	19
3.3.2	Muestra	19
3.4	Materiales, Equipos y Reactivos	20
3.4.1	Materiales de laboratorio	20
3.4.2	Equipos	20
3.4.3	Reactivos	20
3.4.4	Material biológico	21
3.4.5	Otros materiales.	21
3.5	Técnicas y Métodos	21
3.5.1	Recolección de muestras de agua.	21
3.5.2	Equipo Analítico	22
3.5.3	Calibración.	22
3.5.4	Metodología de Análisis de Muestras	22
3.5.5	Preparación de medios	23
3.5.6	Mantenimiento de la cepa N2 del nematodo 41	
3.5.7	Sincronización	26
3.6	Ensayo de Mortalidad	27

CAPÍTULO IV	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	28
DISCUSIÓN.	37
CAPÍTULO V	39
5. CONCLUSIONES	39
CAPÍTULO VI	40
6. RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sitio de muestra de la cuenca hidrográfica Paute.23
- Figura 2.** Ciclo de vida de *C. Elegans*. 31
- Figura 3.** Ensayos de cultivo de vida útil del nematodo *C. Elegans* 43
- Figura 4.** Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (72h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de agua #1 del Río Paute. 50
- Figura 5.** Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (72h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de agua #2 del Río Paute. 51
- Figura 6.** Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (72h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de agua #3 del Río Paute. 52
- Figura 7.** Gráfica de la variación del %CL50 con respecto a las muestras 1, 2 y 3; a las 8, 24, 48 y 72 horas.53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Matriz de información de muestras de agua.	28
Cuadro 2. Mortalidad CL50 de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestra de agua #1 del Río Paute.	29
Cuadro 3. Mortalidad CL50 de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestras de agua del Río Paute.	31
Cuadro 4. Mortalidad CL50 de <i>Caenorhabditis Elegans</i> en muestras de agua del Río Paute.	33
Cuadro 5. Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua #1 del Río Paute.	34
Cuadro 6. Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua #2 del Río Paute.	35
Cuadro 7. Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua #3 del Río Paute.	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Medio K en 500 ml Agua mili Q:	23
Tabla 2. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Medio K en 1000 ml Agua mili Q:	23
Tabla 3. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Agar K en 500 ml Agua mili Q	24
Tabla 4. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Agar K en 1000 ml Agua mili Q:	24
Tabla 5. Procedimiento para la preparación para 50ml de solución Bleach.	25

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Reactivos para la preparación de Agar K.	49
Ilustración 2. Reactivos para la preparación de E. Coli OP50.	49
Ilustración 3. Reactivos para la elaboración de Medio K.	49
Ilustración 4. Reactivos para elaborar solución Bleach.	50
Ilustración 5. Centrifugación para obtener el Pellet.	50
Ilustración 6. Pellet (Huevos en estado embrionario)	50
Ilustración 7. Concentraciones de Cromo Hexavalente determinados en el Espectrofotómetro UV-Visible DR1900 Marca Hach.	51
Ilustración 8. Reactivo para determinación de Cromo Hexavalente.	51
Ilustración 9. Preparación de Cajas Petri.	51
Ilustración 10. Preparación cajas de Micro pocillos con las muestras (1, 2, 3) a diferentes diluciones (100%, 85%, 75%, 50%)	52
Ilustración 11. Traspaso de los nematodos Caenorhabditis Elegans a las cajas de micro pocillos.	52
Ilustración 12. Toma de muestra #1(Unión Río Tomebamba & Río Yanuncay). Río Paute.	52
Ilustración 13. Toma de muestra #2 (Diagonal a la Curtiembre Renaciente). Río Paute.	53
Ilustración 14. Toma de muestra #2 (Final del Río Paute, unión con el Río Milchiching). Río Paute.	53
Ilustración 15. Afluentes que desembocan en el Río Paute.	53
Ilustración 16. Muestras de Agua.	54
Ilustración 17. Tesistas en el Centro de la Ciudad del Río de Estudio.	54
Ilustración 18. Procedimiento de Almohada en Polvo para la determinación de Cromo Hexavalente.	55

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la contaminación del agua se ha visto inmiscuida en afectaciones graves con el medio ambiente, en varios estudios se ha demostrado que 40% de la

población mundial, aún no cuentan con la disponibilidad de servicios de saneamiento adecuados y el mayor impacto lo sufren aquellos países en vías de desarrollo, que descargan cerca del 90% de sus aguas residuales sin ningún tratamiento previo a los ríos, lagos y zonas costeras a su vez contaminando sus fuentes hídricas¹.

La disponibilidad de una buena calidad de agua y de baja cantidad de contaminantes, es necesaria para el consumo humano, la conservación de los ecosistemas y las necesidades productivas. Sin embargo, la utilización de agroquímicos, los desechos industriales y los residuos urbanos afectan los recursos hídricos, ya que se hace indispensable el desarrollo de nuevas herramientas de monitoreo y fiscalización de la calidad del agua².

La actividad extractiva clandestina, representa un problema para el medio ambiente, que son comúnmente generados por las industrias de curtido de pieles y mineras^{3,4}. Estas ocasionan contaminación debido al uso de sustancias químicas, metales pesados, que se utilizan y se generan a lo largo del proceso de extracción, que generalmente al ser vertidas a los ríos aledaños ocasionan una considerable contaminación al efluente vital⁵.

El Nematodo "*C. Elegans*" permitirá determinar si existe o no toxicidad en las muestras de agua⁶ para así tomar conciencia de proponer o implementar el tratamiento del agua residual provenientes de las industrias de extracción minera y de curtido; de esta manera el agua no solo podría ser tratada⁷ y que cumpla con los parámetros de la legislación ambiental, sino que se puede estudiar la absorción y eliminación del material tóxico.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Ecuador se producen cerca de 350 mil cueros y pieles al año, y solo entre 2015 y 2019, las industrias dedicadas al curtido y preparación de cuero creció un 8.6%⁸. Los principales desechos generados en las curtiembres son descargas líquidas provenientes de las diversas etapas de transformación de la piel de bovinos, ovinos o porcinos⁹.

La calidad del agua en los ríos se ha visto afectada a causa de industrias extractivas que producen una cantidad de 1.2 millones de toneladas de desechos y residuos que son emanados de manera directa o indirecta sin tratamiento previo¹⁸. La minería artesanal y

la de pequeña escala por lo general se caracterizan por ser una de las fuentes de contaminación debido al uso de mercurio en el proceso de amalgamación, alrededor de 32 países están actuando arduamente para mitigar la contaminación por mercurio¹⁰.

La industria de la curtiembre se caracteriza por la utilización del cromo (III) que pasa a su estado de oxidación como cromo (VI), la cual es una carga contaminante alta debido a los efectos impredecibles que podría causar en la vida acuática. El cromo (VI) ha sido determinado como un cancerígeno humano^{11,12}.

La actividad extractiva como minería, curtiembres, agrícola en la Ciudad de Cuenca establece un problema para el medio ambiente y el recurso hídrico. Se cree que la calidad del agua del Río Paute se ha visto afectada por las diferentes industrias mencionadas anteriormente, debido al proceso de extracción y el incorrecto manejo de descargas de los efluentes por su contenido de altas concentraciones de metales pesados⁵.

Mediante la exposición a muestras de agua con un organismo modelo como lo es el Nematodo *Caenorhabditis Elegans*, permitirá determinar si existe o no toxicidad en las aguas del Río Paute a través de la concentración letal media "CL50"¹³. Debido a lo cual, se han planteado las siguientes preguntas de investigación:

1.1.1 Problema General

¿Se verá afectado el nematodo *Caenorhabditis Elegans* al ser expuesto en agua del Río Paute? De ser así, ¿Cuál será la concentración letal media CL50 del *Caenorhabditis Elegans* en agua del Río Paute afectado por los desechos de las actividades industriales?

1.1.2 Problemas Específicos

¿Cuáles son las características físicas (pH, temperatura, sólidos disueltos totales y color) de agua del Río Paute?

¿Las aguas del río Paute poseen niveles altos de cromo hexavalente que puede ser contaminante?

¿Cuál será la concentración letal media (CL50) del Nematodo *C. Elegans* en agua del Río Paute mediante bioensayos de toxicidad in vitro?

¿Cuál es la relación de la concentración del cromo presente en agua del Río Paute con los índices de mortalidad (CL50), del bioindicador *C. Elegans*?

1.2 JUSTIFICACIÓN

En Ecuador la actividad extractiva (cuero y metales preciosos) se concentra como unas de las principales fuentes económicas del país, que se han realizado desde la América Precolombina hasta la actualidad. En la provincia del Azuay se ha llevado a cabo las prácticas de extracción minera, producción de pieles y actividades agrícolas típicas de la serranía ecuatoriana^{15,16}.

En los procesos de extracción de metales de alto valor económico, se utilizan reactivos contaminantes como el cianuro y el mercurio, utilizados en los procesos de cianuración y amalgamación. En las actividades de curtido de pieles, se utilizan sales metálicas

como el aluminio, titanio, cromo y como solvente el ácido sulfúrico, las cuales confieren una toxicidad especial¹⁷.

Aquellos reactivos que luego de cumplir su objetivo en los procesos de extracción, al final los residuos generalmente no son tratados y se desechan al medio ambiente, lo cual produce un daño severo al ser humano como resultado final por la toxicidad presente en los residuos¹⁸.

El encargado de proteger los recursos naturales es la constitución del estado ecuatoriano, la cual debe hacer que se cumplan y se respeten las normativas ambientales. Pese aquello, existen aún industrias clandestinas que generan actividades de explotación que no van de acuerdo a la ley, la cual origina un importante problema ambiental^{8,19}.

Debido a los problemas de contaminación en la provincia del Azuay, esta investigación tiene como objetivo de evaluar la toxicidad *CL50* usando como bioindicador el nematodo *Caenorhabditis Elegans* en aguas del Río Paute afectado por las actividades de extracción minera y curtido de pieles²⁰.

1.3 ALCANCE

El presente proyecto contempla los análisis físicos como el pH y temperatura medidos mediante un equipo multiparamétrico “*Analytical Instrument PH-3508*”; sólidos disueltos totales, color y químico el cromo hexavalente mediante la espectrofotometría UV-VISIBLE, así como la verificación de los parámetros de calidad de aguas destinadas para consumo humano con la normativa nacional TULSMA Anexo 1 del Libro VI: Norma de calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua, Criterios de calidad para aguas destinadas al consumo humano y uso doméstico, previo a su potabilización¹⁴.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la toxicidad CL50 usando como Bioindicador el Nematodo “*C Elegans*” en agua del Río Paute – Cuenca, para determinar si cumple o no con la normativa vigente.

1.4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar las características físicas (pH, temperatura, sólidos disueltos totales y color) de agua del Río Paute.
- ✓ Cuantificar la concentración de cromo hexavalente en agua del Río Paute.
- ✓ Determinar la concentración letal media (CL50) del Nematodo *C. Elegans* en agua del Río Paute mediante bio-ensayos de toxicidad in vitro.
- ✓ Relacionar la concentración del cromo presente en agua del Río Paute con los índices de mortalidad (CL50), del bioindicador *C. Elegans*.

1.5 HIPÓTESIS

Existe presencia de cromo hexavalente en las aguas del Río Paute, que provoquen afecciones tóxicas en el nematodo *Caenorhabditis Elegans*.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes del Impacto por la Contaminación de Aguas de Ríos.

La alteración física o química en el agua se denomina contaminación, esta afecta de forma directa a los seres vivos. Existen diferentes tipos de contaminación, y estos varían dependiendo el nivel de desarrollo que tenga un país. Como el agua no mide fronteras existen contaminantes que se generan en un lugar y terminan en otro^{21,22}.

Anualmente se generan millones de toneladas de desechos que se caracterizan por su toxicidad y peligrosidad, la mayor parte de estos terminan en ríos, mares y por ende también aguas subterráneas. A lo largo del tiempo la mala disposición final de residuos y desechos han causado un impacto enorme hacia la contaminación de agua y tierra⁵.

1.1.1 Clases de contaminantes presentes en el agua.

- **Compuestos de fosfatos y nitratos que causan la eutrofización.**
- **Agentes infecciosos:** bacterias, hongos.
- **Compuestos orgánicos tóxicos.**
- **Compuestos inorgánicos tóxicos:** Mercurio, Cromo, Arsénico, Cianuro, Cadmio, Nitratos y nitritos, Sales, Cloruros.

Gran cantidad de las acciones para mitigar la contaminación del agua han sido puntuales, como construir plantas de tratamiento tanto de aguas residuales, como de los lodos generados. Esto permitirá tener un mayor manejo sobre los desechos municipales y así poder tener una mejora considerable en reducir las descargas. Lamentablemente en algunas ciudades no se da el mismo caso, pues sus expansiones no van de acuerdo a las capacidades de las plantas de tratamiento, de esta manera la calidad del agua ha mejorado, pero de una manera mínima en áreas de sobrepoblación^{23,24}.

1.2 Localización del área de estudio

La Ciudad de Cuenca capital de la provincia del Azuay se encuentra ubicada en la parte centro sur de la República del Ecuador.

- Punto 1 (Unión Río Tomebamba & Río Yanuncay)
- Punto 2 (Diagonal a la Curtiembre Renaciente)
- Punto 3 (Final del Río Paute, unión con el Río Milchiching)

Figura 1. Sitio de muestra de la cuenca hidrográfica Paute.



Fuente. Map Gosur (2021).

1.3 Toma de Muestra

Los muestreos se realizaron siguiendo las directrices de la Norma Técnica Ecuatoriana “NTE INEN 2169:2013” el 3 de febrero del 2021 en el Río Paute en 3 puntos ubicados en una zona representativa del Río Paute (Provincia de Azuay, Cuenca), junto a la “Curtiembre Renaciente” hasta antes del punto de unión con el río Milchiching.

Esta zona posee características hidrogeológicas que permiten su aprovechamiento para diferentes usos. Se lograron evidenciar las siguientes características fisicoquímicas mediante analizadores portátiles:

- Temperatura (T)
- pH
- Sólidos disueltos totales (TSD)
- Color.

Cabe recalcar que para análisis en el laboratorio, las muestras se tomaron en tubos estériles y se guardaron a 4 °C hasta su uso²¹.

1.4 Industria de las Curtiembres

La industria de la curtiembre, que utiliza una variedad de productos químicos en el proceso de curtido, es reconocida como uno de los principales contribuyentes de metales pesados al medio ambiente y plantea serias amenazas medioambientales en todo el mundo¹⁶. Los efluentes descargados de la industria del curtido contienen una gran cantidad de desechos líquidos y sólidos con cantidades sustanciales de sustancias químicas tóxicas (sulfato de sodio, hidróxido de sodio, hidrosulfato de sodio, sulfuro de arsénico, hidrosulfato de calcio, dimetilemina, sulfhidrato de sodio y sulfato de cromo; y otros metales traza pesados tóxicos, materia orgánica, cal y sulfuro^{25,26}.

Las plantas de curtido industrial transforman las pieles en cueros mediante una serie de operaciones químicas y mecánicas. Las sales de cromo (en particular, el sulfato de cromo) son las sustancias curtientes más utilizadas en la actualidad²⁷.

Las curtiembres adoptan el curtido al cromo proceso debido a su velocidad de procesamiento, bajos costos, color claro del cuero y mayor estabilidad del cuero resultante. Durante el proceso de curtido, el cuero absorbe entre el 60% y el 80% del cromo aplicado y el resto de sales metálicas suelen verterse en aguas residuales con serias sospechas de impacto ambiental^{28,29}.

1.5 Industria Minera

En la minería se produce una extracción de metales pesados, la cual requiere de diferentes productos nocivos o tóxicos, con altas cantidades de agua en las lagunas que

son utilizadas para la extracción del metal de interés por lo cual existen compuestos químicos adheridos a la clase del suelo o mina que podrían mezclarse entre sí, dando como resultado una aglomeración de sustancias nocivas que son desechadas^{5,30}.

Los subproductos de procesos mineros de relaves y escombros que son desechados directamente a caudales fluviales corresponden una alta toxicidad, estos pueden contener trazas de S, Cd, Pb, As, CN-, Hg y otras clases de compuestos ya sean fenólicos o aromáticos. La contaminación directamente al ambiente se produce al momento que dichos desechos son vertidos al suelo y a ríos sin ninguna clase de tratamiento a esas aguas⁵.

1.6 Sustancias Contaminantes

1.6.1 Industria de la Curtiembre.

Las sustancias químicas contaminantes que son utilizadas en el proceso de ribera de la industria de la curtiembre son: Carbonato de sodio (Na_2CO_3), Hidróxido de sodio (NaOH), Sulfuro de sodio (Na_2S), Cal (CaO), Pesticidas, Detergentes, Cloruro de sodio (NaCl), entre otras^{31,32}.

En el proceso de curtido de la industria de la curtiembre son: Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3), Bisulfito de sodio (NaHSO_3), Acido fórmico (CH_2O_2), Ácido sulfúrico (H_2SO_4), Sulfato de amonio (NH_4) $_2\text{SO}_4$, Sulfato de Cromo ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$), Detergentes, Cloruro de sodio (NaCl), Formiato de sodio (CHO_2Na), Desengrasantes, Sintanos, Solventes^{11,33}.

1.6.2 Industria Minera.

Las sustancias químicas contaminantes que son utilizadas en el proceso de flotación son: Xantatos etílico de potasio y sodio, Xantatos amílico de potasio, Xantatosisopropílico de sodio, Hidróxido de sodio, Ácido sulfúrico, Sulfato de cobre, Acetato de plomo, Silicato de sodio, Sulfato de zinc, Cianuro, Dicromato de potasio, Sulfuro de sodio, Mercurio^{34,35}.

1.7 El Metal Pesado Cromo.

El cromo (Cr) es un elemento metálico que pertenece a la primera serie de transición de la tabla periódica. El cromo tiene 3 formas estables, como metal y aleaciones 0, como trivalente +3 y como estados de valencia +6³⁶. En el estado de valencia +3 la química del cromo está dominada por complejos estables con compuestos orgánicos e inorgánicos, además en el estado de valencia +6 el cromo existe como especies “oxo” como CrO_3 (Óxido de Cromo), CrO_4^{-2} (Cromato) los cuales son altamente oxidantes³⁷.

1.7.1 Efectos del Cromo en Seres Humanos y Animales.

Los efectos del cromo en la salud pueden causar úlceras cromadas, reacciones corrosivas en el tabique nasal, dermatitis irritativa, aguda y alérgica. Se han registrado dermatitis eccematosa entre sujetos expuestos a compuestos del cromo hexavalente, se notificaron ulceraciones o perforaciones del tabique nasal en sujetos tras la exposición por inhalación del cromo +6 como resultados de exposición de a concentraciones de más de $20 \mu g/m^3$ ³⁸.

El cromo +3 es un elemento esencial en el ser humano, además el cuerpo puede desintoxicar cierta cantidad de cromo +6 a cromo +3. Se ha determinado falta de efectos aguda en casos de exposiciones a cromo +6²³. Los estudios en humanos han establecido claramente que el cromo +6 inhalado es un carcinógeno humano, lo que resulta mayor riesgo de cáncer de pulmón. Los estudios en animales han demostrado que el cromo +6 causa tumores pulmonares por inhalación o exposición¹².

1.7.2 Afectaciones del Cromo en la Salud

La determinación de los niveles de Cr en muestras ambientales es de gran importancia porque la toxicidad del cromo es bien conocida. Los dos principales estados de oxidación del Cr (Cr 3+ y Cr 6+) están habitualmente presentes en aguas naturales, pero difieren significativamente en propiedades biológicas, geoquímicas y toxicológicas. Considerando que Cr 3+, en un rango de concentración estrecho, se considera que es menos tóxico e incluso esencial para los mamíferos por diversas vías biológicas (es decir, el metabolismo de la glucosa, lípidos, proteínas, etc.)¹², Cr 6+ Se informa que las sales tienen efectos tóxicos graves en los seres humanos y es fuente de diversas

enfermedades cancerosas. La determinación de trazas de Cr en muestras ambientales es de gran importancia debido a su toxicidad³⁹.

1.7.3 Efectos Ambientales del Cromo

En el medio ambiente este puede provenir de fuentes naturales, usos industriales y de la quema de combustibles fósiles y madera. Las fuentes industriales de cromo más importantes se originan a partir de la producción del ferrocromo⁴⁰:

Refinación y procesamiento de minerales, plantas de producción de cemento, revestimiento de frenos de automóviles y convertidores catalíticos, curtaduras y pigmentos de cromo también contribuyen a la carga atmosférica de cromo⁴¹.

Productos químicos de cromato utilizados como inhibidores de niebla en torres de enfriamiento y la niebla formada durante el cromado son probablemente las fuentes primarias de Cr +6 emitido como nieblas en la atmósfera⁴².

1.7.4 Usos del Cromo Trivalente y Hexavalente.

El cromo metálico se utiliza principalmente para fabricar acero y otras aleaciones. Los compuestos de cromo, tanto en forma de cromo (III) como de cromo (VI), se utilizan para:

- Cromado, fabricación de tintes y pigmentos.
- Conservación del cuero y madera.
- Tratamiento de torres de enfriamiento de agua.
- Se utiliza en cantidades más pequeñas en lodos de perforación.
- Materia textil y tóner para fotocopiadoras⁷.

1.8 Principales parámetros de las aguas residuales en las industrias.

Se ha elaborado una normativa ambiental la cual obligue a las diferentes industrias poder realizar varios análisis físico-químicos en las descargas al medio ambiente. La normativa expresa 16 parámetros para su medición y son los siguientes: sólidos sedimentables, temperatura, pH, sólidos suspendidos, nitratos, cromo hexavalente, mercurio, arsénico, cianuro, DQO, DBO, grasas y color. En base a la normativa los

parámetros son comparados con TULSMA, Libro VI, Anexo I, la cual estas descargas de las aguas residuales sería en el Río Paute²⁵.

1.8.1 Sólidos sedimentables:

Es una medida del volumen de sólidos sedimentados en el fondo del famoso cono *Inhoff* en una hora y la cual representa la cantidad de lodo que se puede eliminar por una sedimentación simple, referida en mililitros/litro (ml/L)².

1.8.2 Temperatura:

Este es un parámetro que afecta a otras características de las aguas residuales, el tratamiento y características finales de eliminación. La contaminación térmica es un problema que limita el aumento y la subsistencia de la vida orgánica en el agua. En sí esta afecta a la vida acuática mediante la transformación del oxígeno disuelto, velocidad de las reacciones químicas, y la existencia de bacterias. La cual el tratamiento del agua debe estar entre 25 ° C y 35 ° C⁴³.

1.8.3 Potencial Hidrogeno (pH)

Este es un parámetro muy importante en las aguas residuales y su tratamiento, porque el agua con un valor de pH menor a 6 promoverá el incremento de hongos, mientras que el agua con un valor de pH mayor 6 formará nitrógeno amoniacal en fase gaseosa. Esta es la razón por la que el pH es esencial para el tratamiento de aguas residuales, pero incluso para promover la vida biológica, por la cual el pH óptimo sería de 6,5 a 8,5^{44,45}.

1.8.4 Sólidos suspendidos:

Estos son los que están formados por partículas que, por su naturaleza coloidal, quedan dispersas en el agua. Dichos sólidos suspendidos no se depositan por gravedad cuando el agua se encuentre en estado de reposo⁴⁶.

1.8.5 Nitratos:

Esta se produce en la oxidación aeróbica del amoníaco y los compuestos nitrogenados orgánicos conduce a la formación de nitritos y luego a nitratos, por lo que un alto

contenido de nitratos y al mismo tiempo bajos niveles de amonio indican que es un agua contaminada durante mucho tiempo⁴⁷.

1.8.6 Cromo hexavalente:

Este es utilizado en el curtido está en forma de sales minerales de cromo trivalente. En varias circunstancias del proceso de bronceado de la piel, el Cr III se oxida en Cr IV, que es tóxico y se considera cancerígeno y mutagénico y se ha demostrado en humanos¹³.

1.8.7 Mercurio

Es un elemento tóxico de la tabla periódica (Hg) denominado como un metal muy importante al momento de contaminar al ambiente, ya que en la minería se lo utiliza para la recuperación del oro a base de amalgamaciones que luego son desechados por relaves afectando directamente a suelos y ríos⁴⁸.

1.8.8 Arsénico

El As es denominado como un metal pesado por sus altos índices de toxicidad en su forma orgánica, este elemento se lo puede encontrar en la minería de manera natural y mediante disoluciones con sustancias químicas se lo libera, la cual causa un impacto ambiental en los suelos y ríos al ser emanados por los relaves mineros¹⁷.

1.8.9 Plomo

El plomo (Pb) es un elemento químico de color gris y en la corteza terrestre se lo puede encontrar en pocas cantidades, este metal es utilizado en diferentes industrias como la minería y la curtiembre, ya que en pequeñas trazas es muy toxico para el ser humano y causa un impacto directo en la contaminación ambiental (aire, suelos y efluentes hídricos) al ser vertidos des pues de diferentes procesos como lo es en el curtido de pieles⁴⁹.

1.8.10 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Este parámetro se utiliza para medir el equivalente de oxígeno de una sustancia orgánica químicamente oxidable usando un agente químico oxidante fuerte en un medio ácido y a temperaturas elevadas. La cual es útil como parámetro de concentración orgánica en aguas residuales industriales o municipales biopeligrosas⁵⁰.

1.8.11 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)

Establece que los microorganismos necesitan una cantidad de oxígeno para descomponer la materia orgánica biodegradable en presencia de aire. La cual se verifica a 20 °C y la prueba se realiza en el laboratorio durante una incubación de cinco días. Es decir, se representa en miligramos de oxígeno por litro de agua¹⁰.

1.8.12 Grasas

Estas sustancias lipídicas que permanecen en la superficie cuando se mezclan con agua provocan la aparición de cremas o en espumas. Se logran medir en solubilidad en hexano.

1.8.13 Espectrofotometría UV-Visible

Es conocida como una técnica analítica que se utiliza para determinar la concentración de un compuesto en una muestra de agua o compuesto en solución. Su principio es la absorción de las radiaciones electromagnéticas, y la medición de la cantidad de luz que fue absorbida por la misma⁵¹.

1.9 Nematodo *Caenorhabditis Elegans*

1.9.1 Características Generales

El nematodo *Caenorhabditis Elegans* de vida libre que se lo encuentra en el suelo, es tolerante a un rango amplio de temperaturas medias, generalmente se encuentra en regiones templadas, se caracteriza por ser un diminuto microorganismo el cual se puede mantener con bajos costos, y mediante técnicas in vitro se puede manipular de manera estándar. Es un organismo que se alimenta de bacterias como *Escherichia coli* o

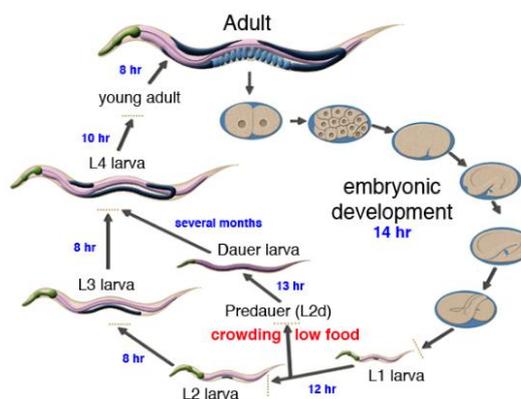
Bacillus subtilis y hongos que se encuentran en el suelo, además de la fruta en descomposición².

Mide poco más de 1mm de largo, generalmente se clasifican en L1, L2, L3, L4, las larvas adultas (L4) son visibles a simple vista, mientras que las demás (L1, L2) y los huevos, es necesario de un Estereomicroscopio para su observación^{20,52}. Existen el sexo macho (XO9) y la forma más abundante hermafrodita (XX), estos gusanos se reproducen mediante autofecundación⁵³.

1.9.2 Ciclo de vida.

El ciclo de vida completo del *C. Elegans* es de aproximadamente 3 a 5 días a 20°C, comienza como un embrión y luego cuatro estados de larva (L1-L2-L3-L4), El estado adulto vive entre 11 a 17 días a una temperatura de 20°C. Los cambios minúsculos de temperatura pueden demorar o agilizar el desarrollo del nematodo^{52,54}, cuando las condiciones ambientales no son favorables para el crecimiento se forma una larva diferente denominada larva *dauer*. Esta larva puede permanecer en un estado de hibernación y seguir con su desarrollo cuando las condiciones ambientales sean favorables².

Figura 2. Ciclo de vida de *C. Elegans*.



Fuente: ⁵⁴

1.9.3 Importancia del Nematodo *Caenorhabditis Elegans* en estudios de toxicidad.

Los estudios que se han hecho sobre la toxicidad donde se han utilizado cualquier cantidad de mamíferos generalmente son costosos y demandan abundante tiempo, por ende, al aumentar el uso de más de un mamífero aumentaría la productividad, sin embargo, aumentará también el costo y el rendimiento disminuirá¹³.

En comparación con las pruebas en mamíferos, los ensayos de toxicidad de *C. Elegans* nos proporcionan datos de un microorganismo completo con sistemas digestivo, reproductivo, endocrino, sensorial, neuromuscular intactos y metabólicamente activos⁵⁵. El tamaño del nematodo permite mantener miles de animales en medios nutritivos controlados, con una capacidad reproductiva de aproximadamente 300 *progenies* por adulto hermafrodita mediante autofecundación^{9,39}.

La factibilidad de cultivo de *C. Elegans* por su tamaño, capacidad para crecer en medios líquidos axénicos, además de los métodos para evaluar la letalidad del nematodo son simples y económicas para instalar en un laboratorio cumpliría con los estándares aceptados para la evaluación de toxicidad con un organismo de laboratorio⁵⁶.

1.10 Marco Legal

1.10.1 Constitución de la República del Ecuador

La Constitución del Ecuador reconoce que el cuidado ambiental debe ser de una manera obligatoria. Las personas o comunidades que vivan en áreas ecológicamente sostenibles deben de garantizar la conservación del ecosistema. En los cuales se mencionan los siguientes artículos⁵⁷:

Art. 14 menciona “Se busca vivir en un ambiente saludable y ecológicamente reflexivo que garantice la sostenibilidad y un buen modo de vivacidad. Se declara de afán donación la conservación de la atmósfera, la preservación de los ecosistemas y la biodiversidad...”^{10,58}.

Art. 15 expresa que “El Gobierno origina el uso de tecnologías amigables con el medio ambiente y energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto en el sector público y privado.”

El Ecuador se obliga a "certificar el derecho tanto individual como colectivo a vivir en una escena saludable y ecológicamente equitativa" mediante el establecimiento de mecanismos efectivos para la inmunización y gendarme del envenenamiento ambiental de áreas naturales degradadas y una guía sostenible de los recursos naturales⁶.

1.10.2 TULSMA: Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente

El TULSMA promueve las políticas ambientales del estado ecuatoriano a través de varios libros como los son:

- Libro I: De la autoridad ambiental
- Libro II: De la gestión ambiental
- Libro III: Del régimen forestal
- Libro IV: De la biodiversidad
- Libro V: De los recursos costeros
- Libro VI: De la calidad ambiental

Libro VI este hace referencia a la regularización de la calidad del suelo, agua, aire y la contaminación de las mismas^{14,59}.

1.10.3 Ley De Gestión Ambiental

En el Art. 21 expresa que “Los métodos de gestión ambiental incluyen inspecciones básicas; evaluación de impacto ambiental; Evaluación de riesgos; planes de tratamiento; planes de gestión de riesgos; sistemas de seguimiento; planes de contingencia y mitigación; auditorías ambientales y planes de salida”⁵⁷.

1.10.4 Ley Orgánica de Salud

En el Art. 103 puntualiza el impedimento de cualquier persona física o jurídica la descarga o eliminación de desechos médicos infecciosos, especiales, tóxicos y peligrosos sin el tratamiento adecuado, debe ser tratado técnicamente antes de la eliminación y la eliminación final debe realizarse en lugares especiales habilitados para tal fin por las autoridades locales del país⁶⁰.

1.10.5 Código Penal

En este reglamento puntualiza el Art. 437 B (Cap. XA) que declara “Quien incumpla la normativa ambiental deberá disponer de cualquier tipo de residuo que exceda los límites legales, si dicha acción daña o altera la flora, fauna, potencial genético, recursos hidrobiológicos o biodiversidad, será sancionado con pena privativa de libertad de uno a tres años, si el acto no constituye un delito opresivo más grave”⁶¹.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de Diseño de Investigación

La presente investigación ejecutada es cuasi experimental, donde se utilizó métodos y procedimientos empleados que ya han sido empleados en diferentes investigaciones de revistas científicas reconocidas.

2.2 Identificación de Variables

2.2.1 Variables independientes

- Concentraciones de Cromo en las muestras de agua.
- Puntos de toma de muestra.

2.2.2 Variables dependientes

- % Mortalidad del Nematodo “*Caenorhabditis Elegans*”
- Concentración letal media (CL50)

2.3 Población y Muestra

2.3.1 Población

Efluente del Río Paute, en la ciudad de Cuenca, perteneciente a la provincia del Azuay.

2.3.2 Muestra

Agua del Río Paute en tres puntos específicos, en el punto 1 al inicio del Río se tomó la muestra 1 (unión entre el río Tomebamba y río Yanuncay), el punto 2 frente a la Curtiembre Renaciente se tomó la muestra 2 y el punto 3 al unirse al río Milchiching se obtuvo la muestra 3.

2.4 Materiales, Equipos y Reactivos

2.4.1 Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación de 50 y 100 ml.
- Frascos ámbar de 500 ml.
- Cajas Petri.
- Tubos Falcon de 15 ml.
- Micro puntas.
- Mechero de Alcohol.
- Lámpara Ultravioleta.
- Pipetas Pasteur.
- Espátula.
- Micro pipetas.
- Erlenmeyer 500 y 1000 ml.
- Tubos de Ensayo.
- Asa de Platino.

2.4.2 Equipos

- Espectrofotómetro VIS DR 1900.
- Cooler
- Estereoscopio binocular marca Labomed Ref. CZM6
- Centrifuga marca Dynac
- Autoclave modelo YX-18 LM
- Estufa
- Refrigerador Electrolux
- Incubadora
- Balanza analítica

2.4.3 Reactivos

- Medio K.
- Agar K.
- Agua destilada - Agua MiliQ.

- 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.

2.4.4 Material biológico

- Nematodos *Caenorhabditis Elegans* cepa N2-N3-N4
- *Escherichia coli* OP50

2.4.5 Otros materiales.

- Papel Periódico.
- Papel Aluminio.
- Cinta de Papel.
- Marcador o rotulador.
- Guantes de látex.
- Mascarilla.

2.5 Técnicas y Métodos

2.5.1 Recolección de muestras de agua.

Se recolectaron muestras de agua en 3 puntos diferentes del Río Paute, la primera muestra en el inicio del Río (unión entre el río Tomebamba y río Yanuncay), segunda muestra frente a la Curtiembre Renaciente y la tercera muestra antes de unirse al río Milchiching. Las muestras de agua fueron recolectadas en botellas de color ámbar como lo establece la Norma INEN 2169:2013²¹, tomadas a 10 cm de la

superficie del río, fueron transportadas en un cooler con hielo para mantener las muestras a una temperatura de 4°C y en el laboratorio fueron almacenadas a -10°C en un freezer²¹.

2.5.2 Equipo Analítico

Para medir la concentración de metales pesados existentes en las diferentes muestras de agua, se las analizó en un Espectrofotómetro VIS portátil de marca *Hach* “*DR 1900*”^{62,63}.

2.5.3 Calibración.

El Espectrofotómetro UV-VIS portátil *Hach DR1900* utiliza una calibración automatizada, al encender el equipo se realizan las mediciones de calibración⁶².

2.5.4 Metodología de Análisis de Muestras

El analito que es de interés en esta investigación es el Cromo Hexavalente. Para ello se utilizará el siguiente método de análisis (Espectrofotometría UV-VISIBLE)⁵¹ que se realizó en el laboratorio de Toxicología Ambiental de la Universidad Técnica de Machala.

2.5.4.1 Procedimiento de almohada en polvo.

1. Se selecciona el programa Cromo, Hex. 0.700 mg/L.
2. Preparación de la muestra: Se llena la celda con 10mL de muestra.
3. Se añade el contenido del reactivo “*Chromaver 3*”.
4. Homogeneizar para mezclar.
5. Encender el temporizador por 5 minutos, para el tiempo de reacción.
6. Se prepara el espacio en blanco con 10 mL (Agua destilada)
7. Limpiar la celda del blanco.
8. Insertar el blanco en el soporte de la celda.
9. Visualizar que la pantalla muestre 0.00 o 0.000 mg/L.
10. Limpiar la celda.
11. Insertar la muestra preparada e la celda preparada.
12. Pulsar LEER. Visualizar que los resultados se muestren en mg/L⁶⁴.

2.5.5 Preparación de medios

Según Lurnia Bernati y Scharrlab Chemie, “para el adecuado estudio del *Caenorhabditis Elegans* es necesario realizar una preparación de medios, la misma que nos ayudará a establecer un sitio de vida y reproducción del nematodo”⁶⁵.

2.5.5.1 Medio k

Es una solución salina que ofrece al *C. Elegans* óptimas condiciones para desarrollar y elaborar investigaciones.

2.5.5.2 Preparación

Se utiliza un frasco según las cantidades y volumen que se va a preparar con las cantidades de sustancias que se detallan a continuación:

Tabla 1. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Medio K en 500 ml Agua mili Q:

KCL	NaCl
1.18 g	1.5 g

Fuente: Autores

Tabla 2. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Medio K en 1000 ml Agua mili Q:

KCL	NaCl
2.36 g	3 g

Fuente: Autores

2.5.5.3 Procedimiento para la preparación de medio K

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

2.5.5.4 Agar K

El cultivo donde se da el crecimiento del nematodo y se establecen condiciones adecuadas para su ciclo de vida, es denominado Agar K. Para realizar la preparación se deben pesar las siguientes cantidades de compuesto, dependiendo el volumen a utilizar⁶⁶.

Tabla 3. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Agar K en 500 ml Agua mili Q

KCL	NaCl	Peptona	Agar
1.18 g	1.5 g	1.25 g	8.5 g

Fuente: Autores

Tabla 4. Cantidad de reactivos que se agregan para la preparación del Agar K en 1000 ml Agua mili Q:

KCL	NaCl	Peptona	Agar
2.36 g	3 g	2.5 g	17 g

Fuente: Autores

2.5.5.5 Procedimiento para la preparación de Agar K

1. Colocar en un Erlenmeyer y homogeneizar.
2. Tapar el Erlenmeyer con papel aluminio mientras calentamos la mezcla.
3. Autoclavar aproximadamente por 1 hora.
4. Dejar enfriar la solución.

Para traspasar el medio K a la caja Petri:

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

2.5.5.6 Solución Bleach

La solución de blanqueo utilizada para sincronizar los nematodos *Caenorhabditis Elegans* en etapa larvaria (L1). El método indica que los nematodos son sensibles a la lejía, sin embargo, la envoltura del huevo protege a los embriones. Después de someterla a un tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio, para conseguir el estado larvario adecuado es necesario incubar los embriones en un medio líquido sin alimento, lo que permite la eclosión⁶⁷.

2.5.5.7 Preparación

Tabla 5. Procedimiento para la preparación para 50ml de solución Bleach.

Agua mili Q	HClO (5%)	NaOH
35 ml	15 ml	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 Bleach* tiene una duración de tres días.

2.5.6 Mantenimiento de la cepa N2 del nematodo *Caenorhabditis Elegans*

Para llevar a cabo el mantenimiento, se procede con los siguientes pasos:

- Preparar el medio de cultivo Agar K.
- Agregar el alimento *Escherichia coli OP50* al medio de cultivo cada 48 horas aproximadamente cinco gotas⁹.
- Observar las cajas petri que contengan la mayor cantidad de nematodos con ayuda del Estereomicroscopio.
- Transferir con el medio K a un tubo falcón de quince mililitros para llevarlo a la centrífuga por dos minutos a 2200 rpm.
- Decantar y colocar por cinco minutos en hielo, removemos el sobrenadante.
- Colocar en una caja petri que esté adecuada para el crecimiento del nematodo².

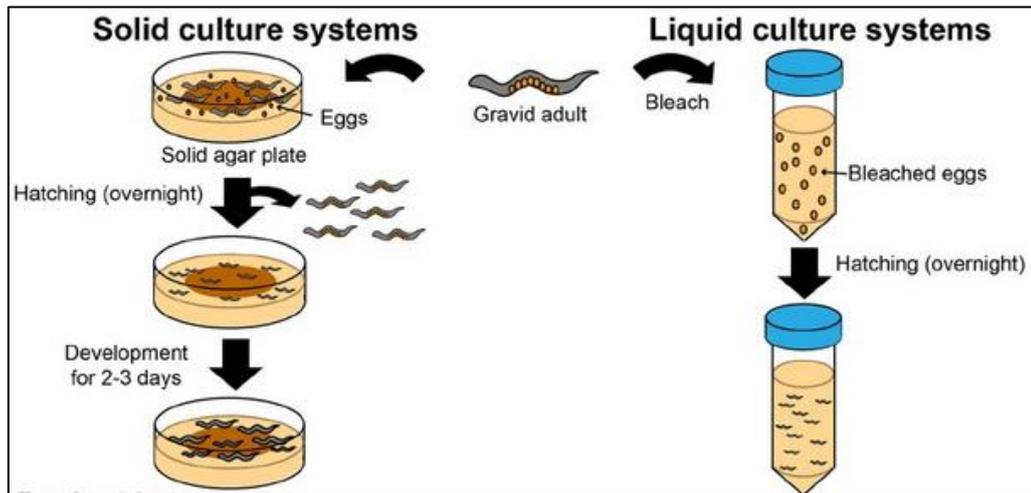
2.5.7 Sincronización

Para realizar la sincronización se siguen los siguientes pasos:

- Verificar que las cajas Petri tengan la suficiente cantidad de huevos del nematodo
- Con el medio K traspasar los nematodos y huevos a un tubo falcón de quince mililitros.
- Centrifugar por dos minutos a 2200 revoluciones por minuto.
- Reposar en hielo durante cinco minutos.
- Eliminar el sobrenadante hasta tener dos mililitros.
- Adicionar diez mililitros de solución *Bleach*,
- Agitar suavemente durante seis minutos y centrifugamos por dos minutos a 2200 revoluciones por minuto.
- Eliminar el sobrenadante hasta dos ml
- Llenar con medio k el tubo falcón hasta quince ml y agitar
- Centrifugar por dos minutos a 2200 revoluciones por minuto.
- Dejar reposar en hielo por cinco minutos.
- Eliminar el sobrenadante hasta dos mililitros.
- Agregar de cuatro a seis ml de medio K.
- Centrifugamos por dos minutos a 2200 revoluciones por minuto.
- Dejar reposar en hielo.
- Eliminar el sobrenadante hasta dos mililitros.
- Colocar en las cajas de cultivo previamente preparadas con sustrato para los nematodos⁵⁵.

Se utiliza esta técnica con el objetivo de eliminar los nematodos y obtenerlos en un estado embrionario, para luego establecer los medios óptimos de crecimiento para obtener una L4 y poder realizar los ensayos toxicológicos.

Figura 3. Ensayos de cultivo de vida útil del nematodo *C Elegans*



Fuente: ^{20,68}

2.6 Ensayo de Mortalidad

Para llevar a cabo los ensayos de mortalidad, se debe utilizar los nematodos L4 (estado larvario) luego de haber sido cultivadas en cajas Petri, para luego traspasar los *Caenorhabditis Elegans* con la ayuda de un aza de platino a las placas de polipropileno de 24 pocillos. Para lograr una mayor confiabilidad, se realiza el ensayo por triplicado y un blanco de Medio K. Con el Estereomicroscopio se da lectura a los organismos a las 8 h, 24 h, 48 h, 72 h para ir conociendo entre estos lapsos de tiempo la mortalidad del nematodo².

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cuadro 1. Matriz de información de muestras de agua.

MATRIZ DE INFORMACIÓN DE MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO PAUTE							
MUESTRAS	Coordenadas UTM	Temperatura °C	Sólidos Disueltos Totales (mg/L)	pH	Color (PtCo)	Fecha y Hora	Concentración de Cromo Hexavalente (mg/L)
M1	2°54'23"S 78°58'58"W	17.2	6	6.73	37	03/02/2021 10:00 am	0.015
M2	2°53'45"S 78°58'09"W	17.8	8	3.87	67	03/02/2021 11:00 am	0.022
M3	2°53'38"S 78°57'56"W	17.9	1	5.80	23	03/02/2021 12:20 am	0.019

Fuente: Autores

En el Cuadro 1, se denota los datos de las diferentes muestras de agua que fueron tomadas en 3 puntos el Río Paute, donde se hallaron parámetros de pH con porcentajes sobre los límites permisibles de la normativa ambiental ecuatoriana. Con respecto a la concentración de Cromo Hexavalente, las 3 muestras se encuentran dentro de los límites permisibles establecidos en el Tulsma Anexo 1 del Libro VI¹⁴.

Los parámetros de Color expresados en unidades de Pt-Co se encuentran dentro de los límites permisibles de la normativa ambiental, y los sólidos disueltos totales que fue un parámetro plus que se lo obtuvo mediante UV-Visible.

Cuadro 2. Mortalidad CL50 de *Caenorhabditis Elegans* en muestra de agua #1 del Río Paute.

Ensayo de Mortalidad													
Muestra #1 de agua del Río Paute													
% Concentración	Expuestos	Tiempo de Exposición											
		8 h			24 h			48 h			72 h		
		M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10	-	0	10	-	0	10	-	0	10	-
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
75	10	0	10		0	10		1	9		1	9	
75	10	0	10	-	0	10	-	1	9	10	1	9	10
75	10	0	10		0	10		1	9		1	9	
85	10	0	10		1	9		1	9		2	8	
85	10	0	10	-	1	9	10	1	9	10	2	8	20
85	10	0	10		1	9		1	9		2	8	
100	10	0	10		1	9		3	7		5	5	
100	10	0	10	-	1	9	10	3	7	30	5	5	50
100	10	0	10		1	9		3	7		5	5	
Blanco	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Blanco	10	0	10	-	0	10	-	0	10	-	0	10	-
Blanco	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

Análisis. Cuadro 1.

En los ensayos de mortalidad, 10 nematodos *Caenorhabditis Elegans* fueron expuestos a diferentes concentraciones (50, 75, 85 y 100 %) en muestras de agua del Río Paute en tiempos de 8, 24, 48 y 72 horas respectivamente. La tasa de mortalidad del *C. Elegans* en el cuadro #2 a las 24 h alcanzó el 10%, a las 48 h alcanzó el 30%, mientras que a las 72 h alcanzó el 50% de mortalidad en la muestra a una concentración del 100%. A una concentración de muestra del 85% a las 24 h alcanzó el 10% y a las 72 h alcanzó el 30% de mortalidad. A una concentración del 75% se observa que alcanzó el 10% de mortalidad en un tiempo de 72 h, mientras que en concentraciones del 50% no se observa porcentajes de mortalidad dentro de las 72 h de exposición del nematodo.

Cuadro 3. Mortalidad CL50 de *Caenorhabditis Elegans* en muestras de agua del Río Paute.

Ensayo de Mortalidad													
Muestra #2 de agua del Río Paute													
% Concentración	Expuestos	Tiempo de Exposición											
		8 h			24 h			48 h			72 h		
		M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT
50	10	0	10	-	0	10	-	0	10	-	1	9	10
50	10	0	10		0	10		0	10		1	9	
50	10	0	10		0	10		0	10		1	9	
75	10	0	10	-	0	10	-	1	9	10	1	9	10
75	10	0	10		0	10		1	9		1	9	
75	10	0	10		0	10		1	9		1	9	
85	10	1	9	10	1	9	10	2	8	20	4	6	40
85	10	1	9		1	9		2	8		4	6	
85	10	1	9		1	9		2	8		4	6	
100	10	1	9	10	2	8	20	5	5	50	8	2	80
100	10	1	9		2	8		5	5		8	2	
100	10	1	9		2	8		5	5		8	2	
Blanco	10	0	10	-	0	10	-	0	10	-	0	10	-
Blanco	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Blanco	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

Análisis. Cuadro 3.

La tasa de mortalidad del *C. Elegans* en el cuadro #3 a las 8 h el 10%, a las 24 h el 20%, a las 48h el 50% y a las 72 h alcanzó el 80% de mortalidad, a una concentración de muestra del 85% a las 24 h alcanzó el 10%, a las 48 h alcanzó el 20% y a las 72 h alcanzó el 40% de mortalidad. A una concentración del 75% se observa que alcanzó el 10% de mortalidad en un tiempo de 48 h, y en concentraciones del 50% se observa porcentajes de mortalidad del 10% a las 72 h de exposición del nematodo.

Cuadro 4. Mortalidad CL50 de *Caenorhabditis Elegans* en muestras de agua del Río Paute.

Ensayo de Mortalidad													
Muestra #3 de agua del Río Paute													
% Concentración	Expuestos	Tiempo de Exposición											
		8 h			24 h			48 h			72 h		
		M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT	M	V	%MT
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
50	10	0	10	-	0	10	-	0	10	-	0	10	-
50	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
75	10	0	10		1	9		2	8		2	8	
75	10	0	10	-	1	9	10	2	8	20	2	8	20
75	10	0	10		1	9		2	8		2	8	
85	10	2	8		2	8		3	7		5	5	
85	10	2	8	20	2	8	20	3	7	30	5	5	50
85	10	2	8		2	8		3	7		5	5	
100	10	2	8		3	7		5	5		8	2	
100	10	2	8	20	3	7	30	5	5	50	8	2	80
100	10	2	8		3	7		5	5		8	2	
Blanco	10	0	10		0	10		0	10		0	10	
Blanco	10	0	10	-	0	10	-	0	10	-	0	10	-
Blanco	10	0	10		0	10		0	10		0	10	

Fuente: Autores

Análisis. Cuadro 4.

La tasa de mortalidad del *C. Elegans* en el cuadro #4 a las 8 h el 20%, a las 24 h el 30%, a las 48 h el 50% y el 80% de mortalidad al ser observado durante el tiempo de 72 h, a una concentración de muestra del 85% a las 24h alcanzó el 20%, a las 48 h alcanzó el 30% y a las 72 h alcanzó el 50% de mortalidad. A una concentración del 75% se observa que alcanzó el 10% de mortalidad en un tiempo de 24 h, a las 72 h alcanzó el 20% y en concentraciones del 50% no se observa porcentajes de mortalidad dentro de las 72 h de exposición del nematodo.

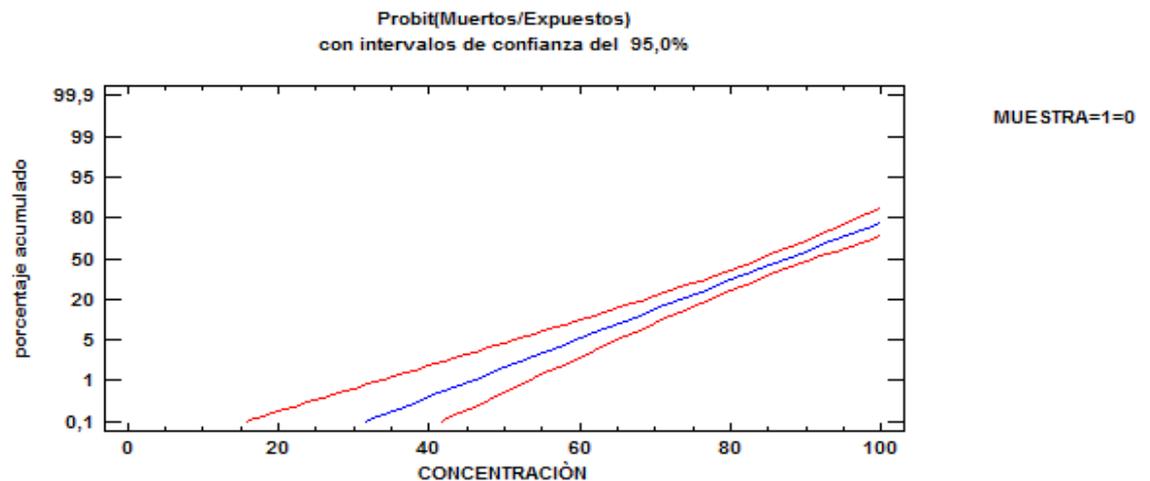
Pese a la baja concentración del metal pesado cromo hexavalente (0.015 mg/l), (0,022 mg/l), (0.019 mg/l) presente en el agua (M1, M2 y M3 respectivamente) y , el mismo que no se encuentra sobre de los límites permisibles establecidos por el Tulsma Libro VI Anexo 1¹⁴.

Cuadro 5. Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua #1 del Río Paute.

Concentración letal media (CL ₅₀)	LC Inferior 95,0%	LC Superior 95,0%
87,4993	84,0984	91,2522

Fuente: Autores

Figura 4. Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (72h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de agua #1 del Río Paute.



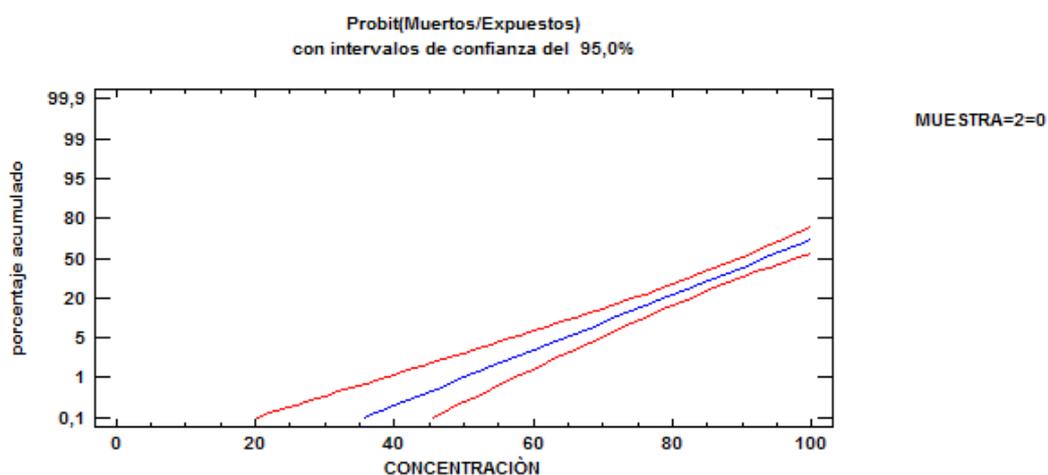
Fuente: Autores

Cuadro 6. Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua #2 del Río Paute.

Concentración letal media (CL_{50})	LC Inferior 95,0%	LC Superior 95,0%
93,2961	87,0372	102,155

Fuente: Autores

Figura 5. Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (72 h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de agua #2 del Río Paute.



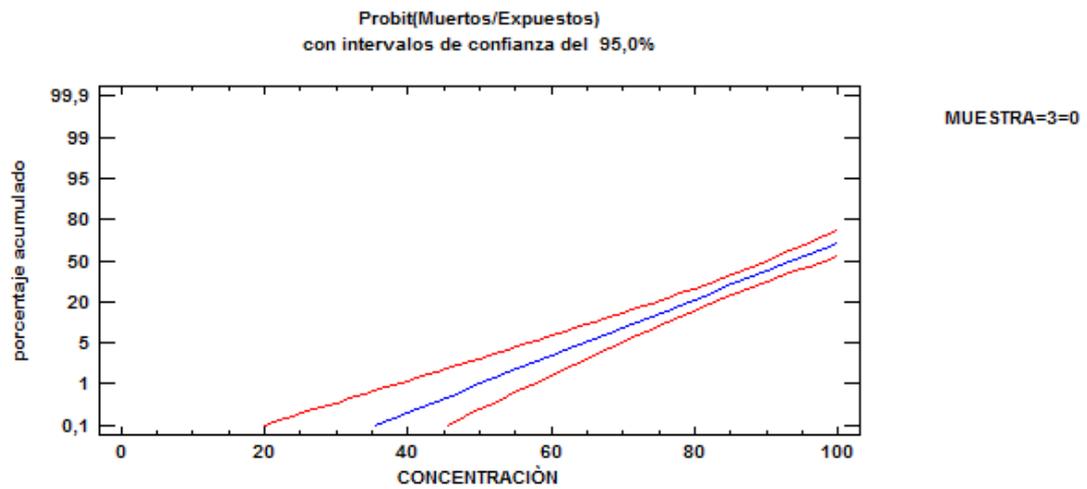
Fuente: Autores

Cuadro 7. Valores del CL50 e intervalos de confianza al 95% para la muestra de agua #3 del Río Paute.

Concentración letal media (CL_{50})	LC Inferior 95,0%	LC Superior 95,0%
93,8027	87,4525	102,926

Fuente: Autores

Figura 6. Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95% para mortalidad (72 h) de *C. Elegans* y concentraciones de la muestra de agua #3 del Río Paute.

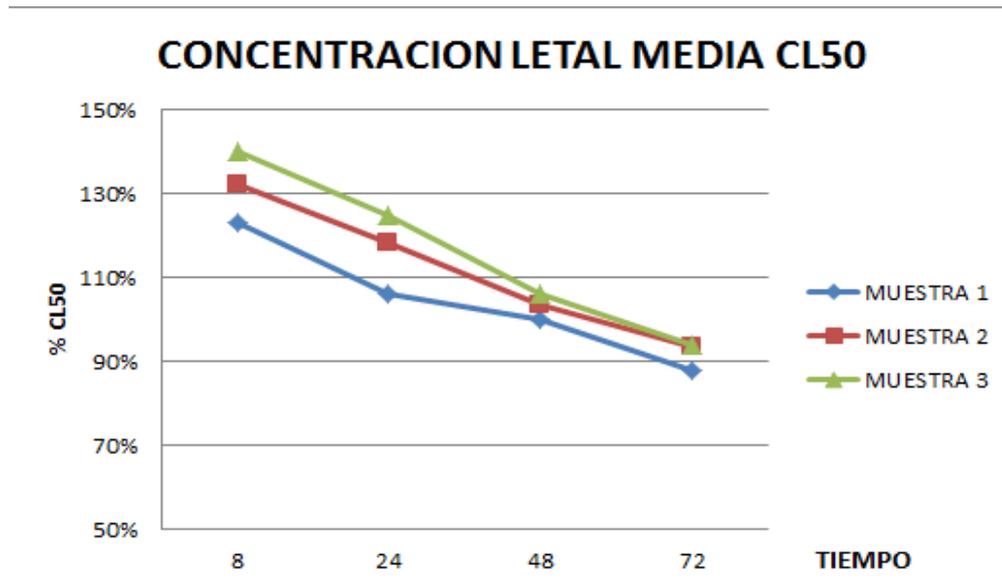


Fuente: Autores

En las (figuras 4, 5, 6) la gráfica Probit se dan a conocer los valores que corresponden al CL_{50} con intervalos de confianza del 95% para las “muestras de agua 1, 2 y 3 del Río Paute” las mismas que se las evaluó en un tiempo de 72 h.

Al obtener estos datos y gráficas es posible proponer que el efecto tóxico se ha demostrado en las muestras de agua a pesar de tener concentraciones de metal pesado “Cromo Hexavalente” por debajo de la normativa nacional. Estas muestras son las que presentan una mayor toxicidad para el nematodo, debido a que se obtuvo una mortalidad CL_{50} en un tiempo de 72 h, con una letalidad del 87,4993; 93,2961; 93,8027 respectivamente.

Figura 7. Gráfica de la variación del %CL50 con respecto a las muestras 1, 2 y 3; a las 8, 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Autores

DISCUSIÓN.

Los nematodos *C. Elegans* están expuestos a las muestras de agua 1, 2 y 3, se ha tomado lecturas de supervivencia de nematodos a las 8 h, 24 h, 48 h y 72 h para registrar supervivencia o deceso de los nematodos. Con respecto a la concentración letal media se pudo evidenciar una mayor letalidad en las muestras 2 y 3 que poseen la mayor concentración de Cromo Hexavalente (0.020 mg/l; 0.019 mg/l respectivamente), realizado en prueba de “Almohada en polvo” con el “Espectrofotómetro DR1900 Marca HACH”. (Cuadro 1)

En estudios realizados con otros organismos acuáticos como *Panagrellus Redivivus*, la concentración letal en Cromo señalaron que este metal puede generar efectos tóxicos a largo plazo en concentraciones de 0.005% ya que se evidencia una notoria disminución en su crecimiento y maduración.

Comparando los estudios realizados con otros organismos acuáticos se puede decir que los valores de letalidad CL_{50} que se obtuvieron en las pruebas de toxicidad, indican que el Nematodo *Caenorhabditis Elegans* posee una aguda sensibilidad en concentraciones bajas de Cromo Hexavalente a pesar de que los niveles de dicho metal se encuentran dentro de los límites permisibles de la normativa nacional.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

- Mediante un equipo multiparamétrico se pudo determinar una variación en las características físicas como el pH (M1= 6.73, M2= 3.87, M3= 5.80) y Temperatura (M1= 17.2, M2= 17.8, M3= 17.9) con respecto a las tres muestras de agua tomadas a lo largo del Río Paute, se determinó que las características físico-químicas se encuentran dentro de los límites establecidos por los entes reguladores.
- De acuerdo a la técnica de “almohada en polvo” mediante espectrofotometría UV-Visible se logró cuantificar la concentración de Cromo Hexavalente en las muestras de agua (M1= 0.015, M2= 0.022, M3=0.019 mg/L) a lo largo del Río Paute, lo cual se concluye que los datos obtenidos de dicho metal se encuentran por debajo de los límites permisibles de la norma nacional.
- Se logró determinar la concentración letal media (CL50) mediante ensayos in vitro, en la muestra de agua #1 es de 87.499%, en la muestra #2 es de 93.296% y en la muestra #3 es de 93.803% en un tiempo de 72 h.
Los *C. Elegans* expuestos a las muestras de agua del río Paute en los puntos 2 y 3 al 100%, mostraron efectos en la mortalidad de un 80 % en el tiempo de 72 horas. En cambio la muestra #1 al 100 %, se evidenció una mortalidad del 50 % a las 72 horas.
- Se evidenció una fuerte asociación entre la presencia del Cromo Hexavalente presente en las muestras de agua del Río Paute, con los índices de mortalidad en un tiempo de 72 horas, pues de acuerdo a diferentes investigaciones realizadas con diferentes organismos modelos, se presume que existe una posible relación de la mortalidad con la toxicidad del cromo, a partir de 48 a 72 horas de exposición.

CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar un análisis del sedimento de las muestras de agua 2 y 3 que se encuentran cerca “Curtiembre Renaciente”, debido a que en los ríos cuando el caudal de agua es bajo, los metales tienden a precipitar en los sedimentos.
- Por las bajas concentraciones de Cromo Hexavalente en el agua del Río Paute, se debe profundizar la investigación con el análisis de los demás metales pesados para encontrar el contaminante que está haciendo efecto en el nematodo, pues por tiempos de pandemia y factibilidad económica no se pudo presentar los demás análisis en la investigación.
- Tomar más puntos de muestras de agua a lo largo del río, sobre todo en los afluentes que desembocan en el Río Paute ya que serían uno de los puntos clave para determinar la contaminación, así se lograría corroborar el compuesto que causa la contaminación del río.
- Por los datos obtenidos en las muestras de agua 2 y 3 del Río Paute, es recomendable establecer mecanismos de acción para eliminar o minimizar la toxicidad por metales pesados, que a pesar de que el Cromo Hexavalente no se encuentra sobre los límites permisibles por la normativa ambiental nacional, pueden existir otros compuestos inorgánicos o metales pesados que estarían causando un impacto notorio en el nematodo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Langergraber, G.; Muellegger, E. Ecological Sanitation - A Way to Solve Global Sanitation Problems? *Environ. Int.* **2005**, *31* (3), 433–444.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.08.006>.
- (2) Kronberg, M. F.; Clavijo, A. M.; Moya, A.; Heredia, O.; Eduardo, A. Utilización Del Nematodo *Caenorhabditis Elegans* En Ensayos de Toxicidad de Muestras de Agua. *2do. ENCUESTRO Investig. EN Form. EN Recur. HÍDRICOS 2014*, <https://www.ina.gob.ar/legacy/ifrh-2014/Eje2/2.19>.
- (3) Martínez Buitrago, S. Y.; Romero Coca, J. A. Revisión Del Estado Actual de La Industria de Las Curtiembres En Sus Procesos y Productos: Un Análisis de Su Competitividad. *Rev. Fac. Ciencias Económicas* **2017**, *26* (1), 113–124. <https://doi.org/10.18359/rfce.2357>.
- (4) Martínez, L.; Vargas, Y. Evaluación de La Contaminación En El Suelo Por Plomo y Cromo y Planteamiento de Alternativa de Remediación En La Represa Del Muña Municipio de Sibaté-Cundinamarca, UNIVERSIDAD DE LA SALLE, 2017.
- (5) Rodrigo Oviedo, -Anchundia; Moína-Quimí, E.; Naranjo-Morán, J.; Barcos-Arias, M. Contaminación Por Metales Pesados En El Sur Del Ecuador Asociada a La Actividad Minera. *Bionatura* **2017**, *2* (4), 437–441.
<https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.5>.
- (6) Carla, E. Evaluación Ecotoxicológica Del Río Uruguay y Efluentes Pre y Post Aplicación de Plaguicidas Utilizando *Caenorhabditis Elegans* Como Biomonitor. *Univ. Fed. do Pampa* **2018**, *33*.
- (7) Beltrán-Pineda, M. E.; Gómez-Rodríguez, A. M. Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Rev. Fac. Ciencias Básicas* **2016**, *12* (2), 172–197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>.
- (8) Santander, B. Evaluación Ambiental Asociada a Los Vertimientos de Aguas Residuales Generados Por Una Empresa de Curtiembres, En La Cuenca Del Río Aburrá., UNIVERSIDAD DE MANIZALES, 2017, Vol. 87.

- (9) Sprando, R. L.; Olejnik, N.; Cinar, H. N.; Ferguson, M. A Method to Rank Order Water Soluble Compounds According to Their Toxicity Using *Caenorhabditis Elegans*, a Complex Object Parametric Analyzer and Sorter, and Axenic Liquid Media. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47* (4), 722–728.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.007>.
- (10) Pauta, G.; Velasco, M.; Gutiérrez, D.; Vázquez, G.; Rivera, S.; Morales, Ó.; Abril, A. Evaluación de La Calidad Del Agua de Los Ríos de La Ciudad de Cuenca, Ecuador. *Maskana* **2019**, *10* (2), 76–88.
<https://doi.org/10.18537/mskn.10.02.08>.
- (11) ESPARZA, E.; GAMBOA, N. Contaminación Debida a La Industria Curtiembre. *Rev. Química* **2001**, *XV*, 24.
- (12) US. EPA, (United States Environmental Protection Agency). Toxicological Review of Trivalent Chromium. *Toxicol. Rev. Trivalent Chromium (CAS No. 16065-83-1) - Support Summ. Inf. Integr. Risk Inf. Syst.* **1998**, No. 16065, 51pp.
- (13) BRAVO, P. M. J. Sobrevivencia Del Nematodo *C. Elgans* Expuesto Al Agua Del Rio Calera Afectado Por La Actividad Minera En El Cantón Portovelo. *Repos. Utmach* **2020**, 67.
- (14) Ministerio del Ambiente. *Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria. Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes : Recurso Agua, Libro 6, Anexo 1 “Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes : Recurso Agua”*; 2019.
- (15) Quispe Yana, R. F.; Belizario Quispe, G.; Chui Betancur, H. N.; Huaquisto Cáceres, S.; Calatayud Mendoza, A. P.; Yábar Miranda, P. S. Concentración de Metales Pesados: Cromo, Cadmio y Plomo En Los Sedimentos Superficiales En El Río Coata, Perú. *Rev. Boliv. Química* **2019**, *2* (36.2), 83–90.
<https://doi.org/10.34098/2078-3949.36.2.3>.
- (16) Greenpeace. Cueros Tóxicos:Nuevas Evidencias de Con_taminación de Curtiembres En La Cuenca Matanza-Riachuelo. *Greenpeace*. 2012, pp 1–27.
- (17) Cebitec, B.-. Metales Pesados Arsénico. *COLOQUIO*. Azuay 2021, pp 73–75.

- (18) Jur, A.; Sea, H.; Sea, H.; Chaumette, P. P. The Mining Reality In Ecuador And The Guarantee Of The Human Rights Of Indigenous Peoples. *Actual. Jurídica Ambient.* **2019**, No. 87, 115–139.
- (19) Whitehead, P. G.; Bussi, G.; Peters, R.; Hossain, M. A.; Softley, L.; Shawal, S.; Jin, L.; Rampley, C. P. N.; Holdship, P.; Hope, R.; Alabaster, G. Modelling Heavy Metals in the Buriganga River System, Dhaka, Bangladesh: Impacts of Tannery Pollution Control. *Sci. Total Environ.* **2019**, 697, 134090. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134090>.
- (20) Roh, J. Y.; Lee, J.; Choi, J. Assessment of Stress-Related Gene Expression in the Heavy Metal-Exposed Nematode *Caenorhabditis Elegans*: A Potential Biomarker for Metal-Induced Toxicity Monitoring and Environmental Risk Assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, 25 (11), 2946–2956. <https://doi.org/10.1897/05-676R.1>.
- (21) Instituto Ecuatoriano de Normalización. *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2266 : 2013 Primera Revisión: AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. DISEÑO DE LOS PROGRAMAS DE MUESTREO*; 2013; Vol. First Edit, pp 1–20.
- (22) Mafla, E. Determinación de Cromo, Plomo y Arsénico En Aguas Del Canal de Riego Latacunga – Salcedo - Ambato y Evaluación de La Transferencia de Dichos Metales a Hortalizas Cultivadas En La Zona; Mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica. **2015**, 219.
- (23) Molina Montoya, N.; Aguilar Casas, P.; Cordovez Wandurraga, C. Plomo, Cromo III y Cromo VI y Sus Efectos Sobre La Salud Humana. *Cienc. Tecnol. para la Salud Vis. y Ocul.* **2010**, 8 (1), 77–88. <https://doi.org/10.19052/sv.831>.
- (24) Silva-Tamayo, J. . Toxicidad de Cromo VI En Aguas de Río Cerca de Las Explotaciones de Ferro- Niquel En El Departamento de Córdoba, Colombia. *ReseachGate*. Houston 2017, p 3.
- (25) LILIANA, Á. M. M. S. C. A. G. M. K.; PEÑA, L. Criterios de Implementación ISO 14000 : 2015 Caso Estudio Sector Carnicos Contexto General Del Sector Productivo. **2019**.

- (26) Bhuiyan, M. A. H.; Suruvi, N. I.; Dampare, S. B.; Islam, M. A.; Quraishi, S. B.; Ganyaglo, S.; Suzuki, S. Investigation of the Possible Sources of Heavy Metal Contamination in Lagoon and Canal Water in the Tannery Industrial Area in Dhaka, Bangladesh. *Environ. Monit. Assess.* **2011**, *175* (1–4), 633–649. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1557-6>.
- (27) Saha, R.; Nandi, R.; Saha, B. Sources and Toxicity of Hexavalent Chromium. *J. Coord. Chem.* **2011**, *64* (10), 1782–1806. <https://doi.org/10.1080/00958972.2011.583646>.
- (28) Flores, D.; Albacura, E.; Achote, J. Tratamiento de Aguas Residuales de La Industria Curtiembre Mediante Carbonización Hidrotermal. *Rev. Ibérica Sist. e Tecnoglogias Inf.* **2020**, *1*, 229–240.
- (29) Lacma, J.; Iannacone, J.; Vera, G. Toxicidad Del Cromo En -Sedimento Usando Donax Obesulus. *Ecol. Apl.* **2007**, *6* (1–2), 93. <https://doi.org/10.21704/rea.v6i1-2.345>.
- (30) Ojeda, J.; Franco, M.; Rodríguez, G. Foetida De Los Jales De Mina De Oro En Mocerito ,. **2019**, *52* (250).
- (31) Duarte, E. Studies of Chromium Removal from Tannery Wastewaters by Chitosan Biosorbents Obtained Shrimp. *Sci. Tech.* **2009**, *2* (42), 290–295.
- (32) Ministerio de Ambiente Ecuador. La Industria De Los Cueros (a Base De Sales De Cromo, Con Agentes Vegetales). *Estud. para Conoc. los potenciales impactos Ambient. y vulnerabilidad Relac. con las Sust. químicas y Trat. desechos peligrosos en el Sect. Product. del Ecuador* **2011**, 127–247.
- (33) Albis Arrieta, A. R.; Ortiz Toro, osé D.; Martínez De la Rosa, J. E. Remoción de Cromo Hexavalente de Soluciones Acuosas Usando Cáscara de Yuca (Manihot Esculenta): Experimentos En Columna. *INGE CUC* **2017**, *13* (1), 42–52. <https://doi.org/10.17981/ingecuc.13.1.2017.04>.
- (34) Hanco, O. M. Reemplazo De Los Colectores Convencionales (Xantatos) Por Colectores Innovadores En El Proceso De Flotacion De Minerales Cupriferos. **2018**, 144.
- (35) Domínguez, M. C.; S, S. G.; A, A. N. A. Fitorremediación de Mercurio

Presente En Aguas Residuales Provenientes de La Industria Minera. *UGCiencia* **2016**, 227–237. <https://doi.org/https://doi.org/10.18634/ugcj.22v.1i.705>.

(36) Rieuwerts, J. Chromium. In *The Elements of Environmental Pollution*; Routledge, 2017; Vol. 3, pp 198–205. <https://doi.org/10.4324/9780203798690-10>.

(37) Tejada Tovar, C.; Villabona Ortiz, Á.; Jiménez Villadiego, M. Remoción de Cromo Hexavalente Sobre Residuos de Cacao Pretratados Químicamente. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. June 30, 2017, pp 139–147. <https://doi.org/10.31910/rudca.v20.n1.2017.71>.

(38) Farabegoli, G.; Carucci, A.; Majone, M.; Rolle, E. Biological Treatment of Tannery Wastewater in the Presence of Chromium. *J. Environ. Manage.* **2004**, 71 (4), 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.03.011>.

(39) Clavijo, A.; Kronberg, M. F.; Rossen, A.; Moya, A.; Calvo, D.; Salatino, S. E.; Pagano, E. A.; Morábito, J. A.; Munarriz, E. R. The Nematode *Caenorhabditis Elegans* as an Integrated Toxicological Tool to Assess Water Quality and Pollution. *Sci. Total Environ.* **2016**, 569–570, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.057>.

(40) Murillo, N.; Díaz Báez, M. Evaluacion de La Toxicidad de Cr+6 , Cu+2 y El Efluente de Cromado de Una Industria Metalmeccánica Utilizando *Panagrellus Redivivus* Como Organismo de Prueba. *Ing. e Investig.* **1997**, 0 (38), 5–13.

(41) Shankar, D.; Sivakumar, D.; Yuvashree, R. Chromium (VI) Removal from Tannery Industry Wastewater Using Fungi Species. *Pollut. Res.* **2014**, 33 (3), 505–510.

(42) Duarte, E. QUITOSAN OBTENIDO DE DESECHOS DE CAMARON Studies of Chromium Removal from Tannery Wastewaters by Chitosan Biosorbents Obtained Shrimp. *Sci. Tech.* **2009**, 2 (42), 290–295.

(43) Tejada, L.; Olivero, J. *Perfil Toxicológico de Los Sedimentos Del Río Magdalena Usando Como Modelo Biológico Caenorhabditis Elegans*; 2016.

(44) ESPARZA, E.; GAMBOA, N. CONTAMINACIÓN DEBIDA A LA

INDUSTRIA CURTIEMBRE. *Rev. Química* **2001**, XV, 24.

(45) Agustini, C. B.; da Costa, M.; Gutterres, M. Tannery Wastewater as Nutrient Supply in Production of Biogas from Solid Tannery Wastes Mixed through Anaerobic Co-Digestion. *Process Saf. Environ. Prot.* **2020**, 135, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.11.037>.

(46) MADELAINE, C.; KATHERINE, A. Evaluación de Toxicidad En Agua Del Proceso de Lavado de Banano Orgánico y Convencional Utilizando Como Bioindicador El Caenorhabditis Elegans, Universidad Tècnica de Machala., 2019.

(47) Williams, L.; Dusenbery, D. B. Aquatic Toxicity Testing Using the Nematode, *Caenorhabditis Elegans*. *Society* **1990**, 9, 1285–1290.

(48) Rocha-Román, L.; Olivero-Verbel, J.; Caballero-Gallardo, K. R. Impacto de La Minería Del Oro Asociado Con La Contaminación Por Mercurio En Suelo Superficial de San Martín de Loba, Sur de Bolívar (Colombia). *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2018**, 34 (1), 93–102. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.08>.

(49) Artica, M.; Sierra, S. Eficiencia de La Cáscara de Castaña y Limón Para La Remoción de Cromo y Plomo En Una Curtiembre de Ate Vitarte. *Univ. CESAR VALLEJO* **2019**, 0–2.

(50) Sivakumar, D. Biosorption of Hexavalent Chromium in a Tannery Industry Wastewater Using Fungi Species. *Glob. J. Environ. Sci. Manag.* **2016**, 2 (2), 105–124. <https://doi.org/10.7508/gjesm.2016.02.002>.

(51) Clingingsmith, T. W. Series Flow Tandem Fan: A High-Speed V/STOL Propulsion Concept. In *SAE Technical Papers*; 1984; pp 1–8. <https://doi.org/10.4271/841496>.

(52) Gonzalez, V.; Cristian, R.; Ricardo, D.; Daniel, B. C. *Elegans* Como Organismo Modelo En Estudios de La Toxicidad Ambiental En Agua y Sedimentos. *Conf. Proc. UTMACH. Vol.2, n°1* **2017**, 2, 8.

(53) Sánchez Hernández, E. Estudio de Un Modelo in Vivo de Los Mecanismos de Acción Implicados En La Actividad Biológica de Polifenoles .” “ Evaluation of Mechanisms of Action Involved in the Biological Activity of Polyphenols Using an in Vivo Model .,” Universidad de Salamanca, 2017.

- (54) Sánchez Hernández, E. Estudio de Un Modelo in Vivo de Los Mecanismos de Acción Implicados En La Actividad Biológica de Polifenoles .” “ Evaluation of Mechanisms of Action Involved in the Biological Activity of Polyphenols Using an in Vivo Model .,” Universidad de Salamanca, 2017.
- (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) Nass, R.; Hamza, I. The Nematode *C. Elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2007**, *31* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0109s31>.
- (57) EPMMQ, E. P. M. M. de Q. *Estudio Del Impacto Ambiental de La Primera Línea Del Metro de Quito*; Quito, 2012; Vol. 1.
- (58) LILIANA, Á. M. M. S. C. A. G. M. K.; PEÑA, L. Criterios de Implementación ISO 14000 : 2015 Caso Estudio Sector Carnicos Contexto General Del Sector Productivo. **2019**.
- (59) Baque Mite, R.; Simba Ochoa, L.; Gonzalez Osorio, B.; Suatunce, P.; Diaz Ocampo, E.; Cadme Arevalo, L. Calidad Del Agua Destinada Al Consumo Humano En Un Cantón de Ecuador / Quality of Water Intended for Human Consumption in a Canton of Ecuador. *CIENCIA UNEMI*. December 20, 2016, pp 109–117. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp109-117p>.
- (60) Ley Orgánica de Salud. Ley Organica de Salud Del Ecuador. *Plataforma Prof. Investig. Jurídica* **2015**, *Registro O*, 13.
- (61) Comisión Legislativa. Código Penal Ecuador. *Regist. Of. Supl. 147 22-ene-1971* **1971**, *1971*, 1–170.
- (62) Díaz, J. *Instructivo de Operación Del Espectrofotómetro Hach Dr1900*; 2018.
- (63) Tatayo Shuguli, L. J. Validación de Los Métodos de Determinación de Cromo Hexavalente y Sulfatos Mediante Espectrofotometría UV-Visible En Aguas Del Distrito Metropolitano de Quito., Escuela Politècnica Nacional, 2018.

- (64) HACH. *Test Procedure: Chromium , Hexavalent*; España, 2019.
- (65) Briz, A. Efecto de Antimicrobianos Sobre La Esperanza de Vida y Puesta de Huevos Del C. Elegans, Universidad Politecnica de Valencia, 2019.
- (66) Brenner, S. The Genetics of Caenorhabditis Elegans. *ChemBioChem* **2003**, 4 (8), 683–687. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300625>.
- (67) Stiernagle, T. Maintenance of C. Elegans. *WormBook* **2006**, No. 612, 1–11. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>.
- (68) Dominguez, R.; Pogo, C. Uso Del Nematodo Caenorhabditis Elegans Como Modeloexperimental Para Determinar Grado De Toxicidad Enrelaves Mineros Del Cantón Portovelo. **2019**, 1–60.

ANEXOS



Ilustración 1. Reactivos para la preparación de Agar K.



Ilustración 2. Reactivos para la preparación de E. Coli OP50.



Ilustración 3. Reactivos para la elaboración de Medio K.



Ilustración 4. Reactivos para elaborar solución Bleach.



Ilustración 5. Centrifugación para obtener el Pellet.



Ilustración 6. Pellet (Huevos en estado embrionario)



Ilustración 7. Concentraciones de Cromo Hexavalente determinados en el Espectrofotómetro UV-Visible DR1900 Marca Hach.

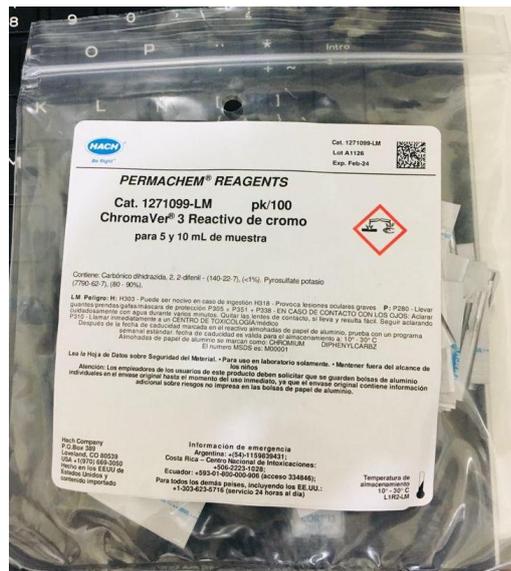


Ilustración 8. Reactivo para determinación de Cromo Hexavalente.



Ilustración 9. Preparación de Cajas Petri.



Ilustración 10. Preparación cajas de Micro pocillos con las muestras (1, 2, 3) a diferentes diluciones (100%, 85%, 75%, 50%)



Ilustración 11. Traspaso de los nematodos *Caenorhabditis Elegans* a las cajas de micro pocillos.



Ilustración 12. Toma de muestra #1(Unión Río Tomebamba & Río Yanuncay). Río Paute.



Ilustración 13. Toma de muestra #2 (Diagonal a la Curtiembre Renaciente). Río Paute.

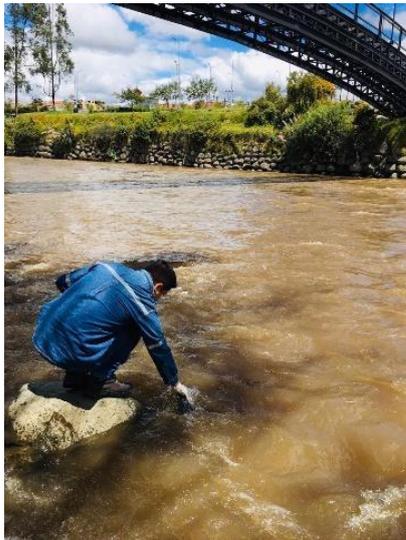


Ilustración 14. Toma de muestra #2 (Final del Río Paute, unión con el Río Milchiching). Río Paute.



Ilustración 15. Afluentes que desembocan en el Río Paute.



Ilustración 16. Muestras de Agua.



Ilustración 17. Tesistas en el Centro de la Ciudad del Río de Estudio.

Procedimiento de almohada en polvo

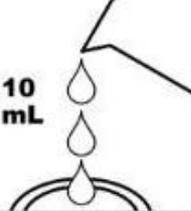
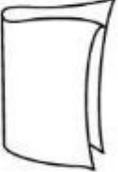
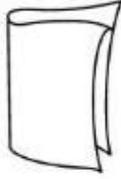
			
<p>1. Iniciar el programa 90 Cromo, Hex. Para obtener información sobre celdas de muestra, adaptadores o escudos de luz, consulte la información específica del instrumento en la página 1.</p>	<p>2. Preparar la muestra: Llene una celda de muestra con 10 mL de muestra.</p>	<p>3. Añadir el contenido de una Chromaver [®] 3 Reactivo Almohada en polvo a la celda de muestra.</p>	<p>4. Resolito para mezclar. Un color púrpura mostrará si el cromo hexavalente está presente.</p>
<p>Nota: Aunque el nombre del programa puede ser diferente entre instrumentos, el número del programa no cambia.</p>			
			
<p>5. Encienda el temporizador del instrumento. Comience un tiempo de reacción de 5 minutos.</p>	<p>6. Prepare el espacio en blanco. Rellene una segunda celda de muestra con 10 mL de muestra.</p>	<p>7. Cuando caduque el temporizador, limpie la celda de muestra en blanco.</p>	<p>8. Inserte el espacio en blanco en el soporte de la celda.</p>
			
<p>9. Empuje a cero. La pantalla muestra 0.00 o 0.000 mg/L. C ⁶⁺ ; r</p>	<p>10. Limpie la celda de muestra preparada.</p>	<p>11. Inserte la muestra preparada en el soporte de la celda.</p>	<p>12. Pulse LEER. Los resultados se muestran en mg/L Cr ⁶⁺</p>
<p>⋮ La pantalla del colorímetro muestra 0.00 mg/L.</p>			
<p>Cromo, hexavalente, método 1,5-difenilcarbohidrazida (0,700 mg/L)</p>			

Ilustración 18. Procedimiento de Almohada en Polvo para la determinación de Cromo Hexavalente.