

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL

EVALUACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS, SOBRE
BIOINDICADORES ACUÁTICOS, PARA DETERMINAR ÍNDICES DE
TOXICIDAD

DETERMINACIÓN DE LOS ÍNDICES DE TOXICIDAD $Cl_{c50\%}$, $Cl_{G50\%}$,
 $Cl_{L50\%}$, EN BIOINDICADORES ACUÁTICOS, A. *CEPA*, *L. SATIVA* Y *D.*
MAGNA, EXPUESTOS AL DISRUPTOR ENDOCRINO ISOFLAVONA
DE SOYA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL

VISCARRA GUALPA ERICK ALEXANDER

erick.viscarra95@gmail.com

DIRECTOR: PhD. ING. BALAREZO AGUILAR ANA LUCIA

ana.balarezo@epn.edu.ec

DMQ, AGOSTO 2023

CERTIFICACIONES

Yo, Erick Alexander Viscarra Gualpa, declaro que el trabajo de integración curricular aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

ERICK ALEXANDER VISCARRA GUALPA

Certifico que el presente trabajo de integración curricular fue desarrollado por Erick Alexander Viscarra Gualpa, bajo mi supervisión.

ANA LUCIA BALAREZO AGUILAR

DECLARACIÓN DE AUDITORÍA

A través de la presente declaración, se afirma que el trabajo de integración curricular aquí descrito, así como el producto resultante del mismo, son públicos y estarán a disposición de la comunidad a través del repositorio institucional de la Escuela Politécnica Nacional; sin embargo, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponde a los autores que han contribuido en el desarrollo del presente trabajo; observando para el efecto las disposiciones establecidas por el órgano competente en propiedad intelectual, la normativa interna y demás normas.

Erick Alexander Viscarra Gualpa

Ana Lucia Balarezo Aguilar

DEDICATORIA

A Dios, por la fuerza, fuerza y determinación para alcanzar mis metas, por él mi soporte diario y por dame la bendición de la familia que tengo. Quiero agradecer a toda mi familia, por el apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, por la guía de mi vida y por brindarme siempre comprensión, así como, fortaleza en los momentos más difíciles.

A mi madre Elizabeth por su paciencia, apoyo y amor incondicional, es la mujer que ha sido mi fortaleza en cada uno de los semestres transcurridos en la carrera, me ha acompañado en todas las decisiones que he tomado y por ello estaré agradecido siempre.

A mi padre Cooper por su amor y aprecio incondicional, por enseñarme el valor y significado del trabajo, así como, el valor de la dedicación. Gracias por siempre estar alado mío y ser responsable con las obligaciones del hogar.

A la directora de tesis la Dra. Ana Lucia Balarezo Aguilar, por la confianza brindada para el desarrollo de este proyecto, por su apoyo, guía, motivación y conocimientos.

INDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIONES	I
DECLARACIÓN DE AUDITORÍA	II
DEDICATORIA	III
INDICE DE CONTENIDO	IV
INDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	2
1.2. Objetivos específicos	2
1.3. Alcance	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Los contaminantes emergentes (CE)	4
2.1.1 Presencia de CE en el ambiente	5
2.1.2 Disruptores endocrinos (DE)	6
2.2 Fitoestrógenos	7
2.2.1 Isoflavona de soya	7
2.2.2 Usos de isoflavonas de soya	9
2.2.3 Efectos de isoflavonas de soya	9
2.4 Toxicidad en ecosistemas y métodos de evaluación	9
2.4.1 Uso de <i>Daphnia magna</i> en ensayos de toxicidad	11
2.4.2 Uso de <i>Lactuca sativa</i> en ensayos de toxicidad	12
2.4.3 Uso de <i>Allium cepa</i> en ensayos de toxicidad	12
2.4.4 Protocolo del ensayo de toxicidad	13
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Fitoestrógeno	15
3.2 Agua de dilución	15
3.3 Preparación de diluciones de la isoflavona de soya	16
3.4 Aclimatación y acondicionamiento de los organismos de prueba	17
3.4.1 Especie <i>Allium cepa</i>	17
3.4.2 Especie <i>Lactuca sativa</i>	18

3.4.3 Especie <i>Daphnia magna</i>	19
3.5 Diseño experimental para la prueba de toxicidad aguda con la especie <i>Allium cepa</i>	19
3.5.1 Parámetros que se mantuvieron constantes durante el periodo de los bioensayos.....	19
3.5.2 Materiales, equipos y reactivo.....	20
3.5.3 Protocolo del bioensayo.....	20
3.6 Diseño experimental para la prueba de toxicidad aguda con la especie <i>Latuca sativa</i>	23
3.6.1 Parámetros que se mantuvieron constantes durante el periodo de los bioensayos.....	23
3.6.2 Equipos, materiales y reactivos.....	24
3.6.3 Protocolo del bioensayo.....	24
3.7 Diseño experimental para la prueba de toxicidad aguda con la especie <i>Daphnia magna</i>	27
3.7.1 Parámetros que se mantuvieron constantes durante el periodo de los bioensayos.....	27
3.7.2 Equipos, materiales y reactivos.....	27
3.7.3 Protocolo del bioensayo.....	28
3.8 Análisis estadístico.....	29
3.9 Aseguramiento y control de calidad.....	30
3.10 Disposición final de desechos.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Resultados y análisis de la prueba de toxicidad aguda de la isoflavona de soya sobre la especie <i>Allium cepa</i>	31
4.1.1 Análisis de los resultados de la evaluación de toxicidad.....	34
4.2 Resultados de la evaluación de toxicidad del fitoestrógeno isoflavona de soya sobre la especie <i>Latuca sativa</i>	35
4.2. Análisis de resultados de la evaluación de toxicidad.....	37
4.3 Resultados de la evaluación de toxicidad del fitoestrógeno isoflavona de soya sobre la especie <i>Daphnia magna</i>	38
4.3.1 Resultados de la evaluación de toxicidad aguda.....	38
4.3.2 Análisis de resultados de la evaluación de toxicidad.....	41
4.4 Análisis comparativo.....	42

4.4.1 Análisis comparativo de los resultados obtenidos entre los organismos <i>Allium cepa</i> , <i>Latuca sativa</i> y <i>Daphnia magna</i> al exponerlos a diferentes concentraciones de isoflavona de soya.....	43
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
5.1 Conclusiones.....	44
5.2 Recomendaciones.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Categorías principales de contaminantes emergentes.....	5
Tabla 2.2 Propiedades farmacocinéticas de isoflavonas de soya.	8
Tabla 2.3 Condiciones para el cultivo de la especie <i>Daphnia magna</i>	12
Tabla 2.4 Tabla de Finney para la transformación del porcentaje de mortalidad o inhibición a valores probit.....	14
Tabla 3.1 Características fisicoquímicas del agua envejecida	16
Tabla 3.2 Condiciones constantes de la prueba de toxicidad con la especie <i>Allium cepa</i>	20
Tabla 3.3 Equipos, materiales y reactivos para el ensayo de toxicidad con la isoflavona de soya en el organismo <i>Allium cepa</i>	20
Tabla 3.4 Longitud promedio de raíces en (mm) de <i>Allium cepa</i> expuestas a las concentraciones de isoflavona de soya por (120 horas).....	23
Tabla 3.5 Condiciones constantes de la prueba de toxicidad con la especie <i>Latuca sativa</i> .	24
Tabla 3.6 Equipos, materiales y reactivos para el ensayo de toxicidad con isoflavona de soya en el organismo <i>Latuca sativa</i>	24
Tabla 3.7 Promedio de elongación en (mm) de <i>Lactuca sativa</i> a diferentes concentraciones de isoflavona de soya en 120 horas.....	26
Tabla 3.8 Semillas germinadas de la especie <i>Lactuca sativa</i> a diferentes concentraciones de isoflavona de soya en 120 horas.....	26
Tabla 3.9 Condiciones para la prueba de toxicidad con la especie <i>Daphnia magna</i>	27
Tabla 3.10 Equipos, materiales y reactivos para el ensayo de toxicidad con la isoflavona de soya en el organismo <i>Daphnia magna</i>	27
Tabla 3.11 El número de neonatos muertos de <i>Daphnia magna</i> luego de 48 horas de exposición.....	29
Tabla 4.1 Logaritmo de la concentración, promedio del porcentaje de inhibición radicular en la especie <i>Allium cepa</i> , porcentaje de inhibición de crecimiento y desviación estándar	31
Tabla 4.2 $Cl_{50\%}$ y límites de confianza para el ensayo de <i>Allium cepa</i> expuestas a la isoflavona de soya por 120 horas.....	33
Tabla 4.3 Logaritmo de la concentración, promedio de elongación y germinación de semillas en la especie <i>Latuca sativa</i> , % de inhibición de germinación y desviación estándar	35
Tabla 4.4 $Cl_{50\%}$ y límites de confianza para el ensayo de <i>Latuca sativa</i> expuestas a la isoflavona de soya por 120 horas.....	37

Tabla 4.5 Logaritmo de la concentración, promedio de organismos muertos, porcentaje de letalidad en la especie <i>Daphnia magna</i> y desviación estándar	39
Tabla 4.6 CL _{50%} y límites de confianza para el ensayo de <i>Daphnia magna</i> expuestas a la isoflavona de soya por 48 horas	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura química más comunes de los disruptores endocrinos	6
Figura 2.2 Estructura de la isoflavona de soya.....	8
Figura 2.3 Vías metabólicas de la isoflavona de soya.	8
Figura 3.1 Fármaco Phyto soya	16
Figura 3.2 Preparación de soluciones diluidas de isoflavona de soya	16
Figura 3.3 Preparación de la especie <i>Allium cepa</i>	17
Figura 3.4 Acondicionamiento de la especie <i>Allium cepa</i>	18
Figura 3.5 Sobre con semillas de lechuga (<i>Latuca sativa</i>).....	18
Figura 3.6 Observación de neonatos de <i>Daphnia magna</i> y limpieza de residuos.....	19
Figura 3.7 Diseño experimental del ensayo de toxicad aguda (120 horas) con la especie <i>Allium cepa</i>	21
Figura 3.8 Diseño experimental de los ensayos preliminares y definitivos.....	22
Figura 3.9 Medición de la longitud promedio de raíces de la especie <i>Allium cepa</i>	22
Figura 3.10 Diseño experimental de los ensayos definitivos.....	25
Figura 3.11 Grupos de prueba de <i>Latuca sativa</i> ingresados a la incubadora	25
Figura 3.12 Diseño experimental de los ensayos definitivos.....	28
Figura 3.13 Grupos de prueba de la especie <i>Daphnia magna</i>	28
Figura 4.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento radicular vs el logaritmo de la concentración de la especie <i>Allium cepa</i> expuesta a la isoflavona de soya.....	32
Figura 4.2 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de isoflavona de soya en la especie <i>Allium cepa</i>	33
Figura 4.3 Porcentaje de inhibición de germinación vs concentración en la especie <i>Latuca sativa</i> expuesta a la isoflavona de soya	36
Figura 4.4 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de isoflavona de soya en la especie <i>Latuca sativa</i>	36
Figura 4.5 Porcentaje de letalidad vs logaritmo de la concentración en la especie <i>Daphnia magna</i>	39
Figura 4.6 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de isoflavona de soya para la especie de <i>Daphnia magna</i>	40
Figura 4.7 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de las especies <i>Allium cepa</i> , <i>Latuca sativa</i> y <i>Daphnia magna</i>	42

RESUMEN

El presente estudio de investigación curricular se centró en determinar los índices de toxicidad aguda tanto de la inhibición del crecimiento radicular ($CI_{C50\%}$), inhibición de germinación ($CI_{G50\%}$) y de letalidad ($CL_{50\%}$), del disruptor endocrino “isoflavona de soya”, sobre tres especies de prueba (*Allium cepa*, *Latuca sativa* y *Daphnia magna*), mediante pruebas estáticas de toxicidad aguda en el laboratorio con un periodo de duración entre 48 y 120 horas, para evaluar el crecimiento y supervivencia de los organismos de prueba.

Se inicio con el cultivo y aclimatación de los organismos de prueba a las condiciones del laboratorio, para luego exponer a los organismos en forma individual o grupal, a soluciones acuosas de diferentes concentraciones de isoflavona de soya, incluyendo a los grupos de control positivo y negativo, por un periodo de exposición determinado. Una vez concluido el periodo de exposición, se determinaron los puntos finales del ensayo, que consistieron en medir la mortalidad o la inhibición, en cada grupo de prueba. Estos resultados se analizaron gráfica y estadísticamente, para calcular los índices de toxicidad.

Finalmente, los resultados estadísticos revelaron que el $CI_{C50\%}$ para *A. cepa* fue de 74.46 mg/L, el $CI_{G50\%}$ para *L. sativa* fue de 1.348 mg/L y el $CL_{50\%}$ para *D. magna* fue de 161.92 mg/L. En resumen, se demostró que la especie vegetal *Latuca sativa* presento una mayor sensibilidad ante la presencia de isoflavona de soya en comparación con la especie animal *Daphnia magna*, que reflejo una mayor tolerancia.

ABSTRACT

The present curricular research study focused on determining the acute toxicity indices of both root growth inhibition (CIC50%), germination inhibition (CIG50%) and lethality (CL50%), of the endocrine disruptor "isoflavone of soybean", on three test species (*Allium cepa*, *Latuca sativa* and *Daphnia magna*), through static tests of acute toxicity in the laboratory with a period of duration between 48 and 120 hours, to evaluate the growth and survival of the test organisms .

It began with the cultivation and acclimatization of the test organisms to laboratory conditions, to then expose the organisms individually or in groups, to aqueous solutions of different concentrations of soy isoflavone, including the positive and negative control groups. for a given exposure period. Once the exposure period was over, the end points of the test were determined, which consisted of measuring mortality or inhibition, in each test group. These results were analyzed graphically and statistically, to calculate the toxicity indices.

Finally, the statistical results revealed that the CIC50% for *A. cepa* was 63.48 mg/L, the CIG50% for *L. sativa* was 10.625 mg/L, and the LC50% for *D. magna* was 161.92 mg/L. In summary, it was shown that the plant species *Latuca sativa* presented a greater sensitivity to the presence of soy isoflavones compared to the animal species *Daphnia magna*, which reflected a greater tolerance.

INTRODUCCIÓN

La creciente industrialización y los avances en la tecnología, movidos por las demandas del aumento poblacional, han transformado la relación del hombre con el medio ambiente de múltiples formas, una de ellas introduciendo una amplia gama de productos químicos a los ecosistemas acuáticos, como son los contaminantes emergentes entre ellos están los fármacos, analgésicos, drogas, pesticidas, aditivos alimentarios, hormonas esteroideas, fitoestrógenos, entre otros, que han ganado reconocimiento como elementos cruciales que demandan una investigación científica detenida, debido principalmente a sus posibles efectos para la salud humana y la de los ecosistemas (Flores Calvo et al., 2017).

Los contaminantes emergentes son compuestos y productos químicos orgánicos que originalmente no han tenido un seguimiento y regulación ambiental. Estos han cobrado importancia por su detección en la naturaleza y su potencial impacto negativo a la salud humana. Su emergencia como una categoría de contaminante se da por los avances tecnológicos que han demostrado su creciente presencia en aguas superficiales, subterráneas y suelo, debido principalmente a la disposición final de efluentes líquidos domésticos, industriales, agrícola, ganaderos, residuos farmacéuticos, y de cosméticos, entre otros (Vasilachi et al., 2021).

Entre estos contaminantes emergentes se encuentran los disruptores endocrinos dado su presencia significativa. Estas sustancias químicas pueden interferir con el sistema hormonal alterando su equilibrio, desarrollo, reproducción y el metabolismo, en los humanos, así como, en la vida silvestre (Pivonello & Diamanti, 2023). Dentro de los disruptores endocrinos también se encuentran los fitoestrógenos, que son sustancias de origen vegetal con una estructura química similar a la del estrógeno endógeno y pueden ejercer efectos hormonales débiles en los organismos. Aunque los fitoestrógenos se consideran seguros en concentraciones moderadas de exposición, su acumulación o consumo excesivo podrían tener efectos adversos (Jargin, 2014).

Esta investigación plantea establecer conocimiento sobre el efecto toxicológico de la isoflavona de soya, un fitoestrógeno, en tres bioindicadores acuáticos, *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* y *Allium cepa*, mediante la exposición de los organismos a diferentes concentraciones del fitoestrógeno, por un periodo de tiempo determinado, para así encontrar mediante observación, medición y cálculos los índices toxicológicos de inhibición del crecimiento radicular ($CI_{50\%}$), como de inhibición de germinación ($CI_{G50\%}$) y de letalidad media ($CL_{50\%}$), para cada especie, con el fin de establecer su sensibilidad frente al fitoestrógeno.

1.1. Objetivo general

Determinar los índices de toxicidad $CI_{50\%}$, $CI_{G50\%}$ y $CL_{50\%}$ del fitoestrógeno isoflavona de soya, sobre los bioindicadores acuáticos *Allium cepa*, *Lactuca sativa* y *Daphnia magna*, mediante pruebas estáticas de toxicidad aguda de 48 y 120 horas.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar el rango de concentraciones letales ($CL_{50\%}$) de disruptores endocrinos sobre especies acuáticas mediante un análisis y revisión bibliográfica.
- Preparar soluciones acuosas de concentraciones decrecientes del fitoestrógeno isoflavona de soya y elaborar el diseño experimental para las pruebas de toxicidad.
- Adquirir, preparar, aclimatar y cultivar los organismos de prueba *Lactuca sativa*, *Allium cepa* y *Daphnia magna*, para utilizar en la experimentación, a través de los protocolos recomendados.
- Diseñar experimentalmente los bioensayos para las pruebas preliminares y definitivas con los bioindicadores acuáticos, en biorreactores de laboratorio.
- Ejecutar las pruebas de toxicidad de acuerdo con el diseño experimental, exponiendo el organismo o grupos de organismos a las soluciones de la isoflavona de soya.

- Observar y registrar los datos de inhibición radicular y de germinación, así como, morbilidad y mortalidad, en cada uno de los organismos de prueba por un tiempo de exposición determinado, para en forma gráfica y estadística, determinar los índices toxicológicos.

1.3. Alcance

El propósito principal de este proyecto de integración curricular fue la determinación de índices de toxicidad clave, como $Cl_{C50\%}$, $Cl_{G50\%}$ y $Cl_{L50\%}$, para el fitoestrógeno isoflavona de soya, en tres indicadores acuáticos: *Allium cepa*, *Lactuca sativa* y *Daphnia magna*. Estos índices se obtuvieron a través de ensayos estáticos de toxicidad aguda, con períodos de exposición que varió de 48 a 120 horas. Para llevar a cabo los ensayos se utilizó organismos aclimatados y cultivados en el laboratorio, lo que garantizó óptimas condiciones de estudio. En los experimentos se involucró tanto grupos de control como (7, 8 y 10) grupos de prueba, cada uno fue expuesto a diferentes concentraciones del fitoestrógeno. Todos los datos generados durante los ensayos fueron sometidos a un análisis estadístico y gráfico, con el fin de calcular y determinar los índices de toxicidad mencionados anteriormente.

CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Los contaminantes emergentes (CE)

Los ecosistemas acuáticos se han visto impactados de manera considerable por la presencia destacada de contaminantes emergentes, dada su capacidad para influir en la calidad del agua y la salud de los organismos que viven en estos hábitats. Estas sustancias tienen el potencial de acumularse en la cadena alimentaria, ejerciendo un impacto en especies como peces, invertebrados y otros organismos que componen la biodiversidad acuática {Formatting Citation}. Además, se ha observado que algunos de ellos pueden tener efectos adversos en la reproducción y el comportamiento de especies acuáticas, lo que puede tener consecuencias ecológicas a largo plazo (Rodriguez-Narvaez et al., 2017)

Los CE son compuestos de distinta procedencia y naturaleza química, no obstante, se reconoce que son principalmente de origen orgánico, están presentes en medicamentos, productos de cuidado personal, aditivos, pesticidas, plastificantes, entre otros (Tang et al., 2019); la Tabla 2.1 presenta las principales categorías de los contaminantes emergentes. Las técnicas analíticas como la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) y otras técnicas instrumentales avanzadas, permiten la identificación y cuantificación de una amplia gama de compuestos en matrices ambientales complejas, como el agua de ríos, lagos y aguas residuales La detección y cuantificación de contaminantes emergentes en el ambiente es un desafío debido a su diversidad química y a menudo a sus bajas concentraciones (ppb y ppt) (Snyder et al., 2003).

Es fundamental comprender los posibles efectos de los contaminantes emergentes en la salud humana. Aunque la exposición directa a estos compuestos a través del agua potable es una preocupación evidente, también se debe considerar la posible exposición a través de alimentos y la inhalación (Fatta Kassinos et al., 2011).

Tabla 2.1 Categorías principales de contaminantes emergentes.

Grupo	Ejemplo
Pesticidas	Atrazina, 2,4-D, pentaclorofenol, diurón
Fármacos y productos de cuidado personal	Analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, reguladores de lípidos, agentes de contraste de Rayos X
Fitoestrógenos	Isoflavonas
Biocidas	Parabenos, neonicotinoides
Hormonas y esteroides	Estradiol, Estrona, Estriol
Aditivos Alimentarios	Acesulfamo
Aditivos de gasolina	Eteres dialquílicos, eter metil-t-butílico
Filtros UV	Benzofenona-3, homosalato, octocrileno
Partículas	Microplásticos
Marcadores Antropogénicos	Bromoformo, Nicotina, Benzotriazol

Fuente: (Núñez-Delgado & Arias-Estévez, 2022)

2.1.1 Presencia de CE en el ambiente

Los contaminantes emergentes también pueden estar presentes en suelos y sedimentos. La escorrentía de aguas pluviales puede transportar estos compuestos desde áreas urbanas y agrícolas, depositándolos en los suelos y sedimentos de ríos y lagos (Gulkowska et al., 2014). La adsorción a partículas sedimentarias y la interacción con la materia orgánica del suelo pueden influir en la persistencia y movilidad de estos contaminantes (Wang et al., 2015).

La presencia de contaminantes emergentes en el ambiente no solo afecta los ecosistemas acuáticos, sino que también plantea cuestionamientos sobre la exposición humana. Se ha demostrado que algunos de estos compuestos pueden ingresar a la cadena alimentaria, afectando a peces y otros organismos acuáticos que son consumidos por seres humanos (Gomez-Eyles et al., 2013).

En un contexto global, se ha demostrado la existencia de diversos tipos de contaminantes emergentes, en la captación de agua para la ciudad de Shanghái, las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARS) del Noreste de Italia, y el agua lluvia de Moscú (Tang et al., 2019). Por otro lado, en un entorno Latinoamérica los estudios demuestran la existencia de CE en el río Atibaia de São Paulo, Brasil, y en las aguas residuales de Montevideo, Uruguay. Consecuentemente, en Ecuador un caso de estudio ha demostrado la presencia de contaminantes emergentes como:

cafeína, sulfametoxazol, venlafaxina, esteroides estrógenos, benzoilecgonina, en los ríos San Pedro, Guayllabamba y Esmeraldas (Carrasco et al., 2017).

2.1.2 Disruptores endocrinos (DE)

Los disruptores endocrinos se describen como sustancias externas que alteran la síntesis, transporte, metabolismo, acción de unión o eliminación de hormonas naturales que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la homeostasis, la producción y/o el comportamiento de los organismos vivos (Diamanti-Kandarakis et al, 2009).

La mayoría de los DEs son compuestos de moléculas pequeñas con estructuras heterogéneas y por lo general tienen una masa molecular menor a 1000 Dalton. Varias de estas moléculas están compuestas estructuralmente de una combinación de moléculas policíclicas, aromáticas o heterocíclicas, a menudo con grupos arilo unidos a grupos que contienen halógenos, como cloruro o bromuro, o a grupos hidroxilo (Diamanti-Kandarakis et al, 2009). La Figura 2.1, muestra la estructura de los disruptores endocrinos más comunes, y las similitudes que presentan entre sí.

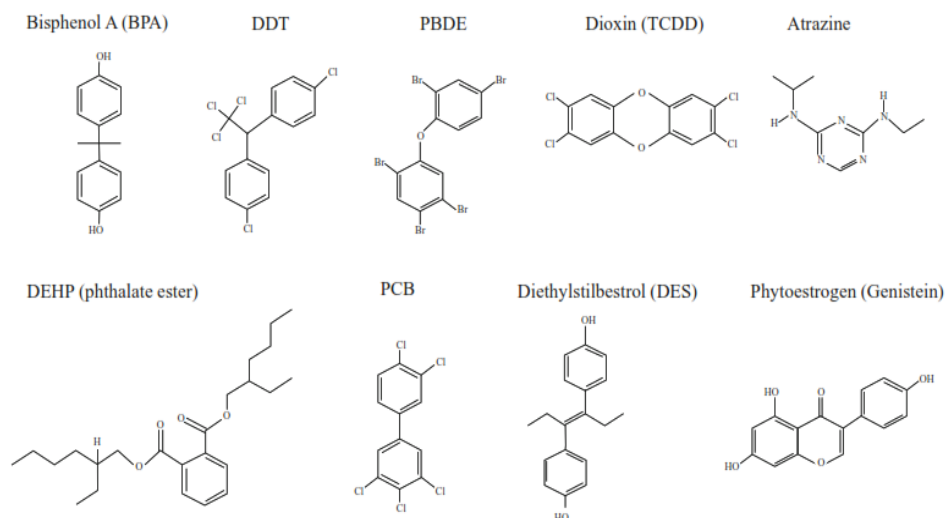


Figura 2.1 Estructura química más comunes de los disruptores endocrinos
Fuente: (Diamanti-Kandarakis et al, 2009).

Los DEs se encuentran en muchas formas en el medio ambiente, como contaminantes en los efluentes de residuos industriales, en pesticidas, en conservantes y como contaminantes de los alimentos o el agua. Por otro lado, los DEs naturales se encuentran en las plantas y pueden introducirse en la cadena alimentaria humana por la ingesta vegetal, tal es el caso de los fitoestrógenos (Diamanti-Kandarakis et al, 2009). Estos se unen a los receptores esteroideos, tienen efectos similares a los esteroides e influyen negativamente en los procesos regulados por hormonas. Los fitoestrógenos a diferencia de los alteradores endocrinos industriales en algunos casos pueden tener efectos beneficiosos (Csaba, 2018).

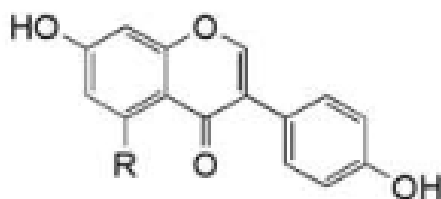
2.2 Fitoestrógenos

Son sustancias de origen vegetal que en su forma estructural y funcional son similares a los estrógenos, entre ellos se encuentran isoflavonas y cumestanos, los mismos que representan los grupos más extensos de estudios. Las isoflavonas se encuentran presentes en distintos tipos de plantas comestibles, siendo la más abundante la soya. El consumo de soya ha sido asociado a efectos favorables de la salud, mientras que sus potenciales efectos adversos han sido infravalorados (Jargin, 2014).

2.2.1 Isoflavona de soya

Las isoflavonas son un grupo de moléculas producidas por plantas de la familia *Fabaceae*; la Figura 2.2 presenta su estructura química. Los fitoestrógenos son considerados similares en estructura al 17-estradiol y poseen capacidad para unirse a los receptores de estrógenos (Tacu et al., 2023). Uno de los medicamentos destacados como líder en consumo para tratamiento hormonal en mujeres, es PHYTO SOYA FORTE, que contiene un 30% de isoflavonas totales (Dermapharm AG, 2011). Numerosos estudios han sugerido que el consumo asociado a las isoflavonas de soya otorga beneficios para la salud como proporcionar protección contra los cánceres hormono-dependientes (Pabich & Materska, 2019). La Figura 2.3, muestra las vías

metabólicas de la isoflavona de soja y sus metabolitos. En la Tabla 2.2 se presenta las propiedades farmacocinéticas de la isoflavona de soja.



Daidzein, R = H
Genistein, R = OH

Figura 2.2 Estructura de la isoflavona de soja.
Fuente: (Preedy, 2013).

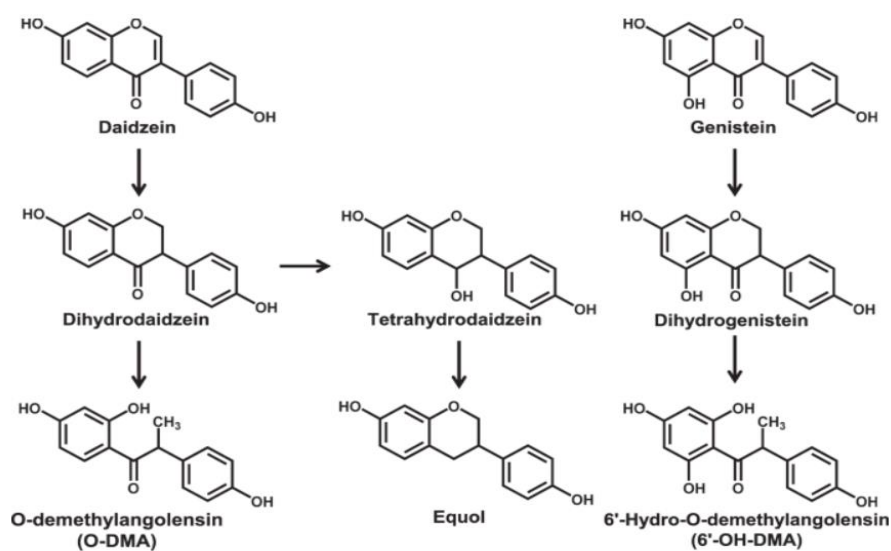


Figura 2.3 Vías metabólicas de la isoflavona de soja.
Fuente: (Mace et al., 2019).

Tabla 2.2 Propiedades farmacocinéticas de isoflavonas de soja.

Propiedad	Descripción
Ingesta	Administración oral, se produce glicolisis y desmetilación
Absorción	Rápida, produce elevada concentración plasmática de las isoflavonas.
Metabolismo	En el hígado
Eliminación	Mediante heces (dos o tres días después de la ingesta) y orina

Fuente: (Dermapharm AG, 2011).

2.2.2 Usos de isoflavonas de soya

Los usos primordiales se originaron hace dos décadas, a raíz de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (IARC), especialmente para el tratamiento de cáncer de mama, esto llevó a la investigación de estos compuestos en relación con la salud cardiovascular, ósea, cognitiva y además al tratamiento de síntomas de la menopausia (Preedy, 2013). Estudios más recientes, confirman el uso farmacéutico de las isoflavonas en el tratamiento de cáncer asociados a afectaciones hormonales, y su efecto en enfermedades cardiovasculares (Pabich & Materska, 2019).

2.2.3 Efectos de isoflavonas de soya

Los efectos de las isoflavonas aún no son concluyentes. No obstante, algunos estudios sugieren que pueden tener un efecto protector contra el cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. Sin embargo, el efecto protector se observó principalmente en estudios de casos retrospectivos y controles, y no fue confirmado por los estudios prospectivos disponibles (Hüser et al., 2018).

2.4 Toxicidad en ecosistemas y métodos de evaluación

La toxicidad se refiere a la capacidad de una sustancia química o física para causar daño a organismos vivos. La evaluación de la toxicidad es fundamental para comprender los posibles riesgos ambientales y de salud asociados a diversas sustancias de uso comercial. Las pruebas de toxicidad biológica son métodos científicos diseñados para medir los efectos adversos de sustancias químicas en organismos vivos. Estas pruebas proporcionan información valiosa sobre los posibles impactos en la salud humana y el medio ambiente (Wheeler et al., 2002).

Toxicidad aguda y crónica:

La toxicidad puede clasificarse en aguda y crónica. La toxicidad aguda se refiere a los efectos adversos que ocurren poco después de una exposición única o corta a

una sustancia (WHO, 2001). Por otro lado, la toxicidad crónica se relaciona con los efectos a largo plazo después de exposiciones repetidas o continuas a bajas concentraciones de sustancias químicas (Slikker et al., 2004).

Pruebas acuáticas de toxicidad aguda:

Las evaluaciones de toxicidad aguda analizan los impactos adversos que se manifiestan de manera inmediata tras una breve exposición a un compuesto químico. El ensayo de toxicidad aguda más común empleado es la prueba de mortalidad, que calcula la concentración letal media (CL_{50%}), siendo esta la concentración que causa la muerte del 50% de los organismos expuestos (USEPA, 2002).

Pruebas acuáticas de toxicidad crónica:

Las pruebas de toxicidad crónica evalúan los efectos a largo plazo después de exposiciones repetidas o continuas a sustancias químicas. Estas pruebas pueden incluir la observación de efectos subletales como cambios en el desarrollo, comportamiento y reproducción (OECD, 2013).

Bioindicadores acuáticos:

Diferentes organismos se utilizan en ensayos de toxicidad debido a su sensibilidad y relación con ecosistemas acuáticos y terrestres. Los bioensayos con invertebrados acuáticos, como *Daphnia magna*, y ensayos con algas, como *Selenastrum capricornutum*, son comunes para evaluar la toxicidad acuática (ASTM, 2010). Los ensayos con embriones de pez cebra *Danio rerio* se utilizan para determinar el efecto agudo y extremo en los organismos de prueba (OECD, 2013).

En síntesis, los ensayos de toxicidad en organismos biológicos son componentes fundamentales para la evaluación de riesgos tanto para el entorno ambiental como para la salud humana, en relación con la exposición a productos químicos sintéticos. Estas evaluaciones ofrecen datos cruciales que respaldan la toma de decisiones informadas sobre la utilización y gestión de sustancias químicas en diversas situaciones (OECD, 2013).

2.4.1 Uso de *Daphnia magna* en ensayos de toxicidad

Daphnia magna es uno de los organismos modelo más utilizado para evaluar la toxicidad de una amplia gama de productos farmacéuticos, como antibióticos, anticancerígenos, antidepresivos, antiinflamatorios, betabloqueantes y agentes reguladores de lípidos, entre otros. En la actualidad, los estudios toxicológicos se utilizan principalmente ensayos de toxicidad basados en la inmovilización aguda y la letalidad de los individuos (Tkaczyk et al., 2021). Estos ensayos generalmente tiene un tiempo de duración para el efecto toxicológico de 24 horas (Saetama et al., 2018).

Dentro de sus características morfológicas se destaca su corto cuerpo, con la cabeza cubierta por un escudo y una primera antena unirramosa, el tórax tiene cinco pares de patas con forma de hoja, que muestran una gran variabilidad en su estructura y función. Su abdomen no tiene extremidades y posee un telson con garras emparejadas en su extremo (Mittmann et al., 2014). Generalmente se alimentan de fitoplancton, espirulina, cepas bacterianas heterótrofas y partículas de materia orgánica terrestre como *Phragmites australis* (Taipale et al., 2014). Estos organismos habitan en agua dulce (Cheban et al., 2018).

Durante la temporada de crecimiento los organismos se reproducen asexualmente, la hembra produce huevos partenogénéticos que se incuban en una bolsa de cría ubicada dorsalmente debajo del caparazón. Los embriones experimentan un desarrollo directo y eclosionan como individuos no completamente extendidos (Mittmann et al., 2014). Las condiciones de cultivo se presentan en la Tabla 2.3. Se deben mantener en grupos de 15 a 20 individuos en frascos de cristal llenos “de medio artificial”, a una temperatura ambiente. Se las alimenta con el alga verde o espirulina, al menos dos veces por semana. La importancia de esta especie radica en el modelo que representa para la ecotoxicología, ya que es sensible a factores de estrés ambiental y a cambios medioambientales (Lee et al., 2019).

Tabla 2.3 Condiciones para el cultivo de la especie *Daphnia magna*.

Parámetro	Valor
Temperatura	(15 – 20°C)
Salinidad	30 g/L
Oxígeno disuelto	6.6 mg/L
pH	8
Conductividad	352 uS/cm
Iluminación	> 2000 lux
Densidad Poblacional	15 – 20 individuos

Fuente: (Mittmann et al., 2014).

2.4.2 Uso de *Lactuca sativa* en ensayos de toxicidad

Es una especie de la familia *Asteraceae*, ampliamente cultivada como hortaliza para su consumo en alimenticio (Rede et al., 2019). No obstante, se reconoce la aplicación de ésta como bioindicador de toxicidad. Respecto a las condiciones de crecimiento tiene modestas exigencias térmicas, y prefiere una buena iluminación durante todo el periodo de crecimiento. La temperatura diurna ideal de crecimiento se sitúa entre los 15-20 °C, mientras que la temperatura nocturna se sitúa entre 10-12 °C. Cuando la temperatura va por encima de los 24-26 °C tienden a frenar o a agotar su desarrollo (Boffelli & Sirtori, 2020).

Para la evaluación de la toxicidad de las semillas, se siguen las directrices establecidas por Saetama et al. (2018), quienes mantienen la evaluación del efecto de inhibición en la germinación y crecimiento de radícula e hipocótilo en semillas, después de 120 horas de exposición a un compuesto toxico (Saetama et al., 2018). La importancia ambiental de la *Lactuca sativa* recae principalmente en la evaluación de la toxicidad de compuestos químicos simbólicos, y a su vez, en la mezcla de los mismos (Rede et al., 2019). Es decir, es un bioindicador que permite ponderar parámetros cualitativos para la indicación biológica de factores ideales en el ambiente (Pereira De Araújo et al., 2022).

2.4.3 Uso de *Allium cepa* en ensayos de toxicidad

Es el mayor género de monocotiledóneas petaloides, con más de 1.100 taxones aceptados. Las características generales de *Allium cepa* son tallo, flores, perigonio y

estambres abiertos (Koçyiğit et al., 2023). La importancia ambiental del *Allium cepa* radica en su aplicación para ensayos. Los ensayos realizados con el organismo son conocidos como métodos eficaces para evaluar efectos tóxicos de sustancias químicas sintéticas. Generalmente, para el estudio toxicológico se utiliza un tiempo de 120 horas en las que se evalúa el crecimiento de las raíces de esta especie (Jiménez, 2018). De manera general, los resultados de ensayos biológicos son herramientas útiles y complementarias para determinar el impacto ambiental de CE's (Herrero et al., 2012).

2.4.4 Protocolo del ensayo de toxicidad

Para realizar con eficiencia una prueba de toxicidad, resulta fundamental seguir los principios esenciales que rigen el diseño de experimentos. Estos conllevan contemplar un número apropiado de repeticiones, el cual varía en función del tipo de prueba en cuestión. Además, es esencial aplicar la aleatorización en la asignación de las dosis a las unidades experimentales y establecer un control riguroso con el propósito de asegurar una estimación precisa del error experimental (Castillo, 2004).

En la mayoría de los ensayos de toxicidad, se emplea un diseño completamente aleatorio de estilo convencional. Este diseño se somete posteriormente a un análisis de varianza o a un análisis de regresión. Se trabaja con unidades experimentales que son homogéneas y se mantienen bajo condiciones ambientales controladas. Los detalles de la estructura de diseño utilizada se pueden encontrar en obras clásicas: "Diseño de experimentos de Steel & Torrie (1985)".

Para llevar a cabo los cálculos necesarios en los diferentes análisis, existen métodos disponibles como la tabla de Finney para la transformación del porcentaje de mortalidad o inhibición a valores probit, como se lo expone en la Tabla 2.4. Método empleado en la presente investigación.

En cuanto a la ejecución de los ensayos de toxicidad, es esencial identificar los elementos clave del diseño experimental. Es importante definir la variable de respuesta (punto final), que puede ser expresada en términos de frecuencia de conteos, tasa de mortalidad, tasa de inhibición, entre otros.

Tabla 2.4 Tabla de Finney para la transformación del porcentaje de mortalidad o inhibición a valores probit

%	0.00	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00
0.00	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10.00	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20.00	4.10	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30.00	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40.00	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50.00	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60.00	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70.00	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80.00	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90.00	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.54	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99.00	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Fuente: (Finney, 1952)

Para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento radicular sobre *Allium cepa*, de acuerdo con Bagur et al., (2011), se expresan en términos del porcentaje de efecto de inhibición de crecimiento radicular (%IC), mediante la siguiente expresión:

$$\%IC = \frac{(\text{Longitud del control} - \text{Longitud de la muestra})}{\text{Longitud del control}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

En el cálculo del porcentaje de inhibición de germinación en el organismo *Latuca sativa*, de acuerdo con Bagur et al., (2011), se expresó en porcentaje de inhibición de elongación de semillas (%IE) y el porcentaje de inhibición de germinación de semillas (%IG), mediante las siguientes expresiones:

$$\%IG = \frac{\text{Número de semillas germinadas en cada concentración de isoflavona de soya}}{\text{Número de semillas germinadas en el control (blanco)}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.2}$$

Para el cálculo del porcentaje de letalidad en *Daphnia magna*, se contabilizó al final del ensayo el número de organismos vivos y mediante la diferencia con el número total se determinó los individuos muertos. Finalmente, se dividió los organismos muertos entre el número total y se múltiplo por 100% para expresar el porcentaje de letalidad.

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

Las pruebas toxicológicas para el presente proyecto se desarrollaron en el Laboratorio Docente de Ingeniería Ambiental (LDIA), durante los meses de abril y mayo del 2023; estos consistieron principalmente en el desarrollo de pruebas de toxicidad acuática, de tipo estático, con un tiempo de exposición de los organismos al toxico (isoflavona de soya), entre 48 a 120 horas. El propósito de los ensayos fue encontrar la concentración letal media en la que el 50% de la población de los individuos muere, se inhibe su crecimiento o germinación ($CI_{C50\%}$, $CI_{G50\%}$ y $CL_{50\%}$). Los bioensayos se desarrollaron siguiendo protocolos estandarizados descritos en APHA, (2018) y en Castillo (2004). Tanto para los ensayos preliminares como para los definitivos, se consideraron variables, parámetros que se mantuvieron constantes y puntos finales. Con los datos generados se procesaron y utilizando el método gráfico, así como, la tabla de Finney PROBIT se estimaron los índices de toxicidad.

3.1 Fitoestrógeno

El disruptor endócrino utilizado en la experimentación fue el fármaco Phyto-soya, producido por la empresa francesa Arkopharma S.A. y es comercializado en el Ecuador por una cadena de farmacias locales. El medicamento contiene 17,5 mg de isoflavonas totales por cada capsula. El Ministerio de Salud clasificó al fármaco como suplemento alimenticio y cuenta con un registro sanitario nacional. El medicamento es prescrito para bajar la intensidad de los sofocos durante la menopausia en mujeres. La muestra comercial del medicamento investigado se presenta en la Figura 3.1.

3.2 Agua de dilución

Para la aclimatación, cultivo y experimentación con los organismos *A. cepa*, *L. sativa* y *D. magna*, se empleó agua envejecida. Esta se obtuvo colocando agua potable en recipientes transparentes PET, de 6 litros de capacidad y se expuso a los rayos solares

por una semana. Las características fisicoquímicas del agua se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características fisicoquímicas del agua envejecida

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	Ambiente
pH	7.8
OD (mg/L)	6.5
Conductividad (uS/cm)	0.28
Dureza Total (CaCO ₃ /L) mgCacO3/L	40
Cloro libre residual	0

Fuente: (Castillo, 2004)

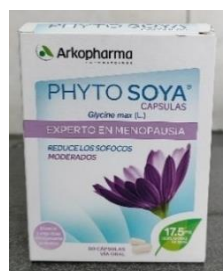


Figura 3.1 Fármaco Phyto soya

3.3 Preparación de diluciones de la isoflavona de soya

Para los bioensayos se preparó una solución madre con una concentración de 175 mg/L de isoflavona de soya, en balones volumétricos de 100 mL. A partir de la solución madre se prepararon inicialmente las concentraciones nominales, considerando un factor de dilución 10 para los biorreactores, así como, para sus réplicas, como se lo presenta en la Figura 3.2.



Figura 3.2 Preparación de soluciones diluidas de isoflavona de soya

3.4 Aclimatación y acondicionamiento de los organismos de prueba

Los organismos *Allium cepa*, *Latuca sativa* y *Daphnia magna*, fueron seleccionados como organismos de prueba dado que están estandarizados para el desarrollo de ensayos de toxicidad APHA (2018). Además, por presentar las siguientes ventajas respecto a otros organismos:

- Hay información abundante sobre estos organismos
- Facilidad de adquisición comercial
- Facilidad en el cultivo y aclimatación a las condiciones del laboratorio
- Abundantes en ecosistemas acuáticos (*D. magna*)
- Bajo costo

Previo a los ensayos de toxicidad los organismos de prueba fueron acondicionados, cultivados y aclimatados a las condiciones de temperatura, calidad de agua y fotoperiodo, en el laboratorio.

3.4.1 Especie *Allium cepa*

Para la limpieza de los organismos de la especie *Allium cepa* una vez adquiridos en el mercado San Roque, se seleccionaron los bulbos frescos, con diámetro de 6 cm aproximadamente, sin tallos superiores y sin raíces pronunciadas. Previo al inicio de los bioensayos se eliminó la epidermis seca y se procedió a cortar las raíces presentes en el área radicular, como se despliega en la Figura 3.3.



Figura 3.3 Preparación de la especie *Allium cepa*

Para el acondicionamiento de los organismos se procedió a dejarlos por dos días con agua envejecida, en vasos plásticos de polipropileno de 100 mL de capacidad, como se muestra en la Figura 3.4. Posteriormente, se cortó todas las raíces hasta tener una longitud inicial de 1 mm y se realizó un control de calidad del material biológico verificando que no exista presencia de hongos.



Figura 3.4 Acondicionamiento de la especie *Allium cepa*

3.4.2 Especie *Latuca sativa*

La especie *Latuca sativa* se obtuvieron en una tienda de productos agrícolas local. La Figura 3.5 expone la presentación comercial de esta especie; en la adquisición se revisó que las semillas no hayan sido tratadas con fungicidas o plaguicidas y que tengan un índice alto de germinación. Las semillas seleccionadas se conservaron y mantuvieron selladas en su envase de origen, a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad y en un lugar seco y fresco.



Figura 3.5 Sobre con semillas de lechuga (*Latuca sativa*)

3.4.3 Especie *Daphnia magna*

Para la aclimatación de los organismos de prueba *Daphnia magna*, se adquirieron en la tienda especializada en acuariofilia Kasacuاريو. En el laboratorio los organismos fueron colocados en un recipiente de vidrio de 3 litros de capacidad; para el cultivo y reproducción se utilizó agua envejecida y se empleó el suplemento alimenticio espirulina cada dos días; además, se mantuvieron condiciones estables de temperatura entre 21 ± 2 °C y fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. Cada tres días se removieron los neonatos, se limpió y se alimentó. Para la limpieza se utilizó una pipeta para retirar las mudas y los restos de alimento acumulados en el fondo de los recipientes. Finalmente, se restituyó el volumen de agua, reemplazando 1/3 del mismo con agua envejecida, como se lo expone en la Figura 3.6.



Figura 3.6 Observación de neonatos de *Daphnia magna* y limpieza de residuos

3.5 Diseño experimental para la prueba de toxicidad aguda con la especie *Allium cepa*.

3.5.1 Parámetros que se mantuvieron constantes durante el periodo de los bioensayos

Durante el bioensayo de toxicidad se mantuvieron constantes los parámetros que se exponen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Condiciones constantes de la prueba de toxicidad con la especie *Allium cepa*

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	15 a 20
Intensidad de luz (horas)	12 h de luz y 12 h de oscuridad
Agua de dilución	Agua envejecida
Volumen de la solución de prueba (ml)	30
Número de concentraciones	10
Número de cebollas por réplica	1
Número de réplicas	2
Tipo de control negativo	Agua envejecida
Tipo de control positivo	Solución acuosa de isoflavona de soya con 1750 mg/l
Tiempo de duración de la prueba (h)	120
Efecto medido	Inhibición de crecimiento radicular
Resultado final	CI _{50%}

3.5.2 Materiales, equipos y reactivo

Los materiales, equipos y reactivos utilizados para el desarrollo de los ensayos de toxicidad en el laboratorio se encuentran detallados en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Equipos, materiales y reactivos para el ensayo de toxicidad con la isoflavona de soya en el organismo *Allium cepa*

Equipos	Materiales	Reactivo
Balanza analítica	Vasos plásticos de 100 mL Regla Palillos redondos Tijeras	Isoflavona de soya Agua envejecida

Los recipientes de laboratorio para los ensayos de toxicidad fueron vasos transparentes de polipropileno de 100 mL de capacidad y 6 cm de profundidad.

3.5.3 Protocolo del bioensayo




























Inicialmente se ordenaron y etiquetaron los recipientes en grupos de 3 cada uno, luego en cada vaso se colocaron 30 mL de solución de isoflavona de soya, con las concentraciones iniciales de 175 mg/L, 17.5 mg/L, 1.75 mg/L, 0.175 mg/L, 0.0175 mg/L, 0.00175 mg/L y 0.000175 mg/L, además de los controles negativo (agua

envejecida) y positivo (1750 mg/L), así como, para sus dos replicas respectivamente. Posteriormente, se adicionó un organismo de prueba previamente acondicionado de *Allium cepa* (bulbo de cebolla) en cada vaso transparente. En total se utilizaron 27 unidades experimentales y se verificó que cada bulbo quede inmerso en la solución acuosa. En total se trabajó con 7 grupos preliminares de concentraciones de isoflavona de soya, un grupo de control negativo (0 mg/L) y un grupo de control positivo (1750 mg/L). La Figura 3.7 muestra el diseño experimental.



Figura 3.7 Diseño experimental del ensayo de toxicad aguda (120 horas) con la especie *Allium cepa*

Periódicamente los biorreactores fueron alimentados con soluciones frescas de isoflavona de soya para mantener inmerso el sistema radicular, así como, también se observó el crecimiento radicular en cada uno de los bulbos. Después de 120 horas los bulbos fueron removidos de los recipientes y se procedió a medir la elongación de las raíces, de todas las unidades experimentales y sus 2 réplicas. Debido a que no se presentó una inhibición del crecimiento radicular en las concentraciones utilizadas se procedió a incrementar el rango de concentraciones de isoflavona de soya a 575 mg/L, 975 mg/L y 1375 mg/L. En los ensayos definitivos se utilizaron 36 unidades experimentales en 10 grupos a diferentes concentraciones, un grupo de control negativo (0 mg/L) y un grupo de control positivo (1750 mg/L). La Figura 3.8 muestra el diseño experimental con los ensayos preliminares y definitivos realizados.

ENSAYOS PRELIMINARES										
Grupo de prueba	Concentración	Control positivo (1750 mg/L)	Control negativo (0 mg/L)	Dilución 1 175 mg/L	Dilución 2 17.5 mg/L	Dilución 3 1.75 mg/L	Dilución 4 0.175 mg/L	Dilución 5 0.0175 mg/L	Dilución 6 0.00175 mg/L	Dilución 7 0.000175 mg/L
Ensayo										
Replica 1										
Replica 2										





































ENSAYOS DEFINITIVOS													
Grupo de prueba	Concentración	Control positivo (1750 mg/L)	Control negativo (0 mg/L)	Dilución 1 1375 mg/L	Dilución 2 975 mg/L	Dilución 3 575 mg/L	Dilución 4 175 mg/L	Dilución 5 17.5 mg/L	Dilución 6 1.75 mg/L	Dilución 7 0.175 mg/L	Dilución 8 0.0175 mg/L	Dilución 9 0.00175 mg/L	Dilución 10 0.000175 mg/L
Ensayo													
Replica 1													
Replica 2													

Figura 3.8 Diseño experimental de los ensayos preliminares y definitivos

La Figura 3.9 expone como se realizó la medición longitudinal promedio de las raíces de los bulbos de cebolla, posteriormente los valores medidos fueron registrados en una hoja de cálculo. La Tabla 3.4 exhibe los datos promedio de las mediciones experimentales.



Figura 3.9 Medición de la longitud promedio de raíces de la especie *Allium cepa*

Tabla 3.4 Longitud promedio de raíces en (mm) de *Allium cepa* expuestas a las concentraciones de isoflavona de soya por (120 horas)

Concentración de isoflavona de soya (mg/L)	Individuos expuestos por grupo	Promedio radicular en (mm)		
		Ensayo	R1	R2
Control negativo (Blanco) 0	1	14,6	18,4	14,5
Control positivo (1750)	1	0	0	0
1375	1	0	0	0
975	1	0	0	0
575	1	4	2	4
175	1	7,2	4,8	6
17,5	1	17,3	12,5	26
1,75	1	19,5	18,7	16,7
0,175	1	13	17,5	20,8
0,0175	1	14,4	9,8	14,5
0,00175	1	14,3	10,4	11,8
0,000175	1	12,5	15,6	13,2

3.6 Diseño experimental para la prueba de toxicidad aguda con la especie *Latuca sativa*

3.6.1 Parámetros que se mantuvieron constantes durante el periodo de los bioensayos

Durante el bioensayo de toxicidad se mantuvieron constantes los parámetros que se exponen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Condiciones constantes de la prueba de toxicidad con la especie *Latuca sativa*

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	15 a 20
Intensidad de luz (horas)	24 h de oscuridad
Agua de dilución	Agua envejecida
Volumen de la solución de prueba (ml)	3,5
Número de concentraciones	7
Número de semillas por réplica	20
Número de réplicas	2
Tipo de control negativo	Agua envejecida
Tipo de control positivo	Solución acuosa de isoflavona de soya con 1750 mg/l
Tiempo de duración de la prueba (h)	120
Efecto medido	% de germinación, elongación de radícula e hipocótilo
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Germinación > 90%, coeficiente de variación >30% en control negativo

3.6.2 Equipos, materiales y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos utilizados para el desarrollo de los ensayos de toxicidad en el laboratorio, se encuentran descritos en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Equipos, materiales y reactivos para el ensayo de toxicidad con isoflavona de soya en el organismo *Latuca sativa*

Equipos	Materiales	Reactivo
Cámara oscura termostatizada	Cajas petri de 10 cm diámetro	Isoflavona de soya
	Papel filtro Whatman	
Balanza analítica	Pinzas	Agua envejecida
	Regla	

Los recipientes de laboratorio para los ensayos de toxicidad fueron cajas Petri de vidrio, transparentes de 10 cm de diámetro y 1 cm de profundidad, con el objeto de observar el número de especies en germinación.

3.6.3 Protocolo del bioensayo

Inicialmente se agruparon y etiquetaron las cajas Petri, en grupos de 3 cada uno, en la base de cada caja se colocó papel filtro cualitativo del tamaño menor a la base, posteriormente, sobre el papel fueron dispensados 3.5 mL de cada solución de isoflavona de soya con concentraciones de 175 mg/L, 17.5 mg/L, 1.75 mg/L, 0.175

mg/L, 0.0175 mg/L, 0.00175 mg/L y 0.000175 mg/L, en 3 cajas Petri por concentración, además, de los controles negativo (agua envejecida) y positivo (1750 mg/L). A continuación, se distribuyó homogéneamente 20 semillas de *Lactuca sativa* sobre el papel filtro humedecido en cada caja Petri. En total se utilizaron 27 unidades experimentales. A continuación, se verificó que cada semilla permanezca en contacto con la solución, se revisó que no existan burbujas en el papel filtro y se tapó cada una de ellas. La Figura 3.10 muestra el diseño experimental y la Figura 3.11 muestra los grupos de prueba. Finalmente, se ingresó todos los grupos a la incubadora a una temperatura de 22 ± 2 °C y se cubrieron todas las unidades experimentales con una funda negra.




























ENSAYOS DEFINITIVOS										
Grupo de prueba	Concentración	Control positivo (1750 mg/L)	Control negativo (0 mg/L)	Dilución1 175 mg/L	Dilución2 17.5 mg/L	Dilución3 1.75 mg/L	Dilución 4 0.175 mg/L	Dilución 5 0.0175 mg/L	Dilución 6 0.00175 mg/L	Dilución 7 0.000175 mg/L
Ensayo										
Replica 1										
Replica2										

Figura 3.10 Diseño experimental de los ensayos definitivos



Figura 3.11 Grupos de prueba de *Lactuca sativa* ingresados a la incubadora

Después de 120 horas de exposición, se contabilizó el número de semillas germinadas, se midió la elongación radicular por unidad experimental y se registraron los valores en una hoja de cálculo. La Tabla 3.7 presenta los datos del promedio de elongación radicular de las 20 semillas y la Tabla 3.8 presenta los datos promedio de germinación de las 20 semillas por cada grupo experimental.

Tabla 3.7 Promedio de elongación en (mm) de *Lactuca sativa* a diferentes concentraciones de isoflavona de soya en 120 horas.

Concentración de isoflavona de soya (mg/L)	Individuos expuestos por grupo	Promedio radicular en (mm)		
		Ensayo	R1	R2
Control negativo (Blanco) 0	20	59,5	56,8	62,3
Control positivo (1750)	20	-	-	-
175	20	53,1	27,0	46,7
17,5	20	58,9	60,8	52,7
1,75	20	25,8	17,6	36,4
0,175	20	27,0	48,6	45,8
0,0175	20	47,3	58,3	59,9
0,00175	20	42,0	58,0	36,0
0,000175	20	25,3	31,5	27,2

Tabla 3.8 Semillas germinadas de la especie *Lactuca sativa* a diferentes concentraciones de isoflavona de soya en 120 horas.

Concentración de isoflavona de soya (mg/L)	Individuos expuestos por grupo	Número de semillas germinadas		
		Ensayo	R1	R2
Control negativo (Blanco) 0	20	18	18	19
Control positivo (1750)	20	0	0	0
175	20	12	7	8
17,5	20	12	8	13
1,75	20	3	5	6
0,175	20	3	9	6
0,0175	20	3	8	11
0,00175	20	1	3	4
0,000175	20	7	3	1

3.7 Diseño experimental para la prueba de toxicidad aguda con la especie *Daphnia magna*

3.7.1 Parámetros que se mantuvieron constantes durante el periodo de los bioensayos

Durante el bioensayo de toxicidad se mantuvieron constantes los parámetros que se exponen en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Condiciones para la prueba de toxicidad con la especie *Daphnia magna*

Parámetro	Valor
Inicio de la fase larvaria	Estadio Nauplio II-III
Tipo de prueba	Estático
Temperatura (°C)	15 a 20
Intensidad de luz (horas)	24 h de oscuridad
Agua de dilución	Agua envejecida
Volumen de la solución de prueba (ml)	20
Número de concentraciones de exposición	8
Número de nauplios expuestos	30
Número de réplicas	2
Tipo de control negativo	Agua envejecida
Tipo de control positivo	Solución acuosa de isoflavona de soya con 1750 mg/l
Punto final	Mortalidad
Tiempo de duración de la prueba (h)	48
Efecto medido	CL _{50%}
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Mortalidad ≤ 10% en control negativo

3.7.2 Equipos, materiales y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos utilizados para el desarrollo del ensayo de toxicidad en el laboratorio se encuentran descritos en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Equipos, materiales y reactivos para el ensayo de toxicidad con la isoflavona de soya en el organismo *Daphnia magna*

Equipos	Materiales	Reactivo
Estereoscopio	Pipetas Pasteur	Isoflavona de soya
	Vasos plásticos	
Balanza analítica	Aireador	Agua envejecida
	Espirulina	

Los recipientes de laboratorio para los ensayos de toxicidad fueron vasos transparentes de polipropileno, de 100 mL de capacidad y 6 cm de profundidad.

3.7.3 Protocolo del bioensayo

Inicialmente se ordenaron y etiquetaron los recipientes en grupos de 3 cada uno, luego en cada vaso se colocó 20 mL de solución de isoflavona de soya con las concentraciones iniciales de 350 mg/L, 175 mg/L, 17.5 mg/L, 1.75 mg/L, 0.175 mg/L, 0.0175 mg/L, 0.00175 mg/L y 0.000175 mg/L, además de los controles negativo (agua envejecida) y positivo (1750 mg/L), así como para sus dos replicas, respectivamente. Posteriormente, en cada recipiente fueron colocados 30 neonatos de la especie *D. magna*, asegurando que todos estén vivos. En total se utilizaron 30 unidades experimentales y se trabajó con 8 grupos de concentraciones de isoflavona de soya, un grupo de control negativo (0 mg/L) y un grupo de control positivo (1750 mg/L). La Figura 3.12 muestra el diseño experimental de ensayos definitivos y la Figura 3.13 muestra los grupos de prueba.






























ENSAYOS DEFINITIVOS											
Grupo de prueba	Concentración	Control positivo (1750 mg/L)	Control negativo (0 mg/L)	Dilución 1 350 mg/L	Dilución 2 175 mg/L	Dilución 3 17.5 mg/L	Dilución 4 1.75 mg/L	Dilución 5 0.175 mg/L	Dilución 6 0.0175 mg/L	Dilución 7 0.00175 mg/L	Dilución 8 0.000175 mg/L
Ensayo											
Replica 1											
Replica 2											

Figura 3.12 Diseño experimental de los ensayos definitivos



Figura 3.13 Grupos de prueba de la especie *Daphnia magna*

Después de transcurridas 48 horas de exposición a las diferentes concentraciones de isoflavona de soya, se realizó el conteo de neonatos muertos por cada vaso utilizando un estereoscopio, considerándose muertos aquellos organismos que no presentaron ningún movimiento durante al menos 10 segundos. Los datos del número de organismos muertos por cada grupo fueron registrados en una hoja de cálculo. La Tabla 3.11 presenta el número de neonatos muertos.

Tabla 3.11 El número de neonatos muertos de *Daphnia magna* luego de 48 horas de exposición

Concentración de isoflavona de soya (mg/L)	Individuos expuestos por grupo	Número neonatos muertos		
		Ensayo	R1	R2
Control negativo (Blanco)	30	0	0	0
Control positivo (1750)	30	30	30	30
350	30	18	21	12
175	30	15	9	15
17,5	30	6	12	9
1,75	30	0	3	0
0,175	30	0	0	0
0,0175	30	0	0	0

3.8 Análisis estadístico

Con propósitos estadísticos, durante la experimentación se trabajó con grupos de control y grupos de prueba, además de llevar a cabo dos replicas por cada grupo, se empleó el método estadístico establecido por Finney (1952), el cual mediante la Tabla 2.2 se transforma el porcentaje de mortalidad o inhibición a valores Probit para obtener una gráfica linealizada de la relación del % de mortalidad o inhibición versus el logaritmo de las dosis (concentración), la ecuación y su respectivo coeficiente de regresión lineal.

3.9 Aseguramiento y control de calidad

Para asegurar la calidad de los datos registrados durante los ensayos de toxicidad se siguió las recomendaciones establecidas en los protocolo y procedimientos por APHA (2018). Para disminuir los errores analíticos en esta investigación fueron considerados los siguientes estándares de calidad:

- a) Se aseguro que los organismos de prueba estuvieran saludables al iniciar los ensayos
- b) La calidad del agua envejecida cumplió con los criterios establecidos por protocolos de ensayo de toxicidad acuática
- c) Se consideró como criterio mínimo de sobrevivencia en la especie *Latuca sativa* que exista germinación con un mínimo de 1 mm de crecimiento del hipocótilo, por otro lado, para la especie *Daphnia magna* se consideró como criterio mínimo de sobrevivencia que después de 10 segundos y agitación del recipiente no exista movimiento de los organismos.
- d) Se utilizaron 2 réplicas por cada grupo experimental y controles positivo y negativo para cada especie con las que se realizaron los ensayos de toxicidad

3.10 Disposición final de desechos

Los efluentes líquidos resultantes del ensayo de toxicidad fueron almacenados en recipientes plásticos para posteriormente ser dispuestos en una fosa séptica y los organismos de prueba fueron incinerados en el domicilio del investigador.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados y análisis de la prueba de toxicidad aguda de la isoflavona de soya sobre la especie *Allium cepa*.

Con base a los datos obtenidos experimentalmente en la prueba de toxicidad aguda de la isoflavona de soya, presentados en la Tabla 3.4, se calculó el promedio y el porcentaje de inhibición de crecimiento radicular utilizando la ecuación 2.1, así como, la desviación estándar, como se muestra en la Tabla 4.1. Los resultados fueron utilizados para realizar la curva de porcentaje de inhibición de crecimiento radicular versus el logaritmo de la concentración de isoflavona de soya que se muestra en la Figura 4.1

Tabla 4.1 Logaritmo de la concentración, promedio del porcentaje de inhibición radicular en la especie *Allium cepa*, porcentaje de inhibición de crecimiento y desviación estándar

Concentración de isoflavona de soya (mg/L)	Logaritmo de concentración	Promedio de inhibición radicular (mm)	% Inhibición de crecimiento	Desviación estándar
Control negativo (Blanco)	-	15.83	-	2.687
Control positivo (1750)	3.243	0	100.00	0
1375	3.138	0	100.00	0
975	2.989	0	100.00	0
575	2.760	3.30	78.95	1.155
175	2.243	6.00	62.11	1.200
17,5	1.243	18.60	-17.47	6.843
1,75	0.243	18.30	-15.58	1.442
0,175	-0.76	17.10	-8.00	3.915
0,0175	-1.76	12.90	18.53	2.685
0,00175	-2.76	12.17	23.16	1.976
0,000175	-3.76	13.77	13.05	1.626

En la Figura 4.1 se determinó gráficamente el $CI_{50\%}$ (Concentración Inhibitoria del crecimiento radicular correspondiente al 50% de los organismos expuestos). Para lo cual se trazó una recta en el eje de las ordenadas desde el punto que equivale al 50% hasta cortar la curva. Finalmente, se trazó una línea perpendicular hasta cortar con el eje de las abscisas, obteniendo un valor del logaritmo de la concentración igual a 2.05 que corresponde a la concentración $CI_{50\%}$ de 112.20 mg/L de isoflavona de soya.

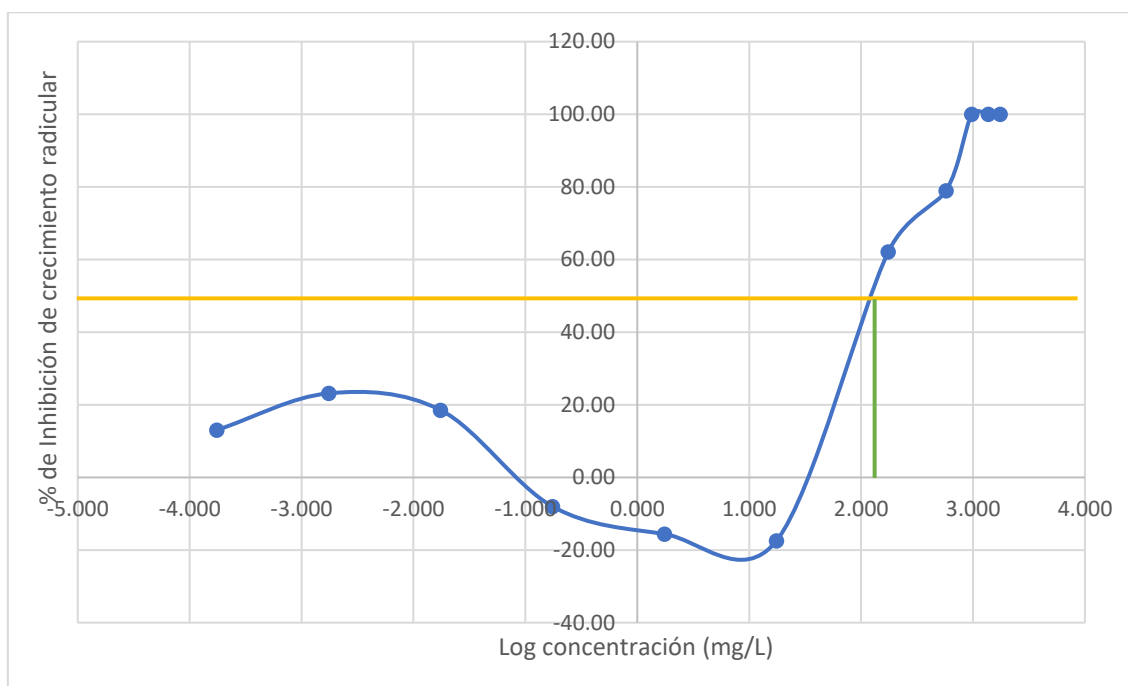


Figura 4.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento radicular vs el logaritmo de la concentración de la especie *Allium cepa* expuesta a la isoflavona de soya

$$CI_{50\%} = 112.20 \text{ mg/L}$$

Adicionalmente, para subir la precisión de ($CI_{50\%}$), en base a los resultados del % de inhibición de crecimiento radicular expuestos en la Tabla 4.1 y excluyendo datos de % negativo, se transformó los porcentajes de inhibición a valores probit por medio de la Tabla 2.4 de Finney. A partir de los valores probit obtenidos versus el logaritmo de la concentración de isoflavona de soya, se obtuvo la gráfica linealizada, así como, la ecuación y el coeficiente de determinación, como se lo muestra en la Figura 4.2.

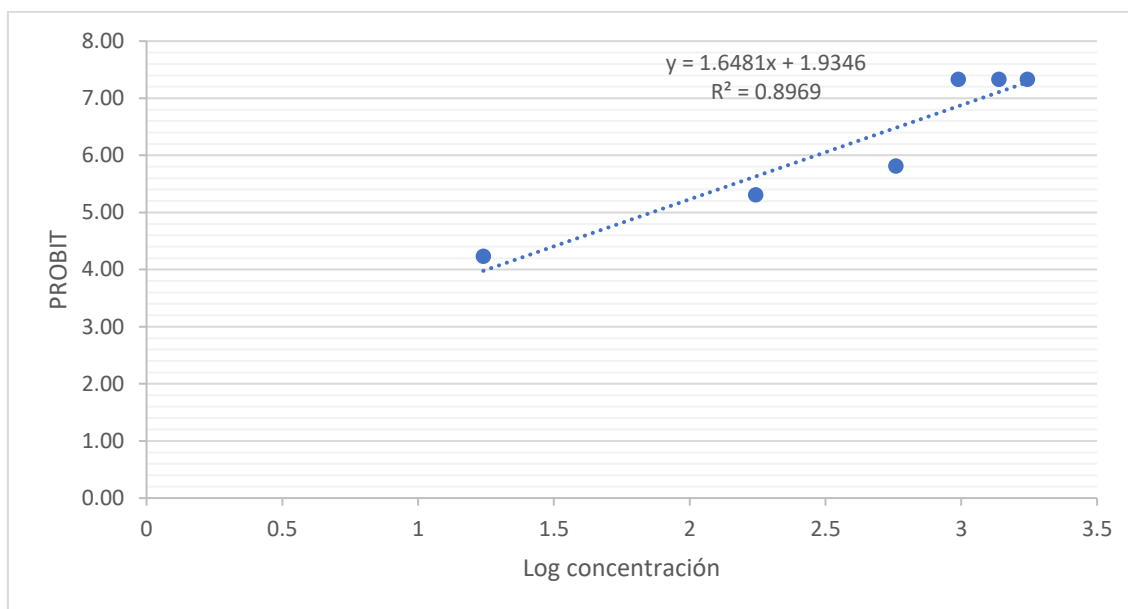


Figura 4.2 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de isoflavona de soja en la especie *Allium cepa*

Mediante la ecuación linealizada se determinó la concentración de inhibición media de crecimiento ($Cl_{C50\%}$) aplicando el método de Finney, (1952), para lo cual se toma en consideración que, (Y) corresponde al valor probit de 5 y para determinar el logaritmo de la concentración de inhibición al 50%, se despejará la variable X de la ecuación. Finalmente, se determinó la inhibición de crecimiento para diferentes porcentajes, así como, sus límites inferiores y superiores a partir de la desviación estándar, como se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 $Cl_{C50\%}$ y límites de confianza para el ensayo de *Allium cepa* expuestas a la isoflavona de soja por 120 horas

CI	Concentración mg/L	Intervalo de confianza 95%	
		Límite inferior	Límite superior
$Cl_{C35\%}$	9.06	5.14	12.98
$Cl_{C40\%}$	18.29	14.37	22.21
$Cl_{C45\%}$	36.90	32.98	40.82
$Cl_{C50\%}$	74.46	72.06	76.86
$Cl_{C55\%}$	150.26	147.86	150.50
$Cl_{C60\%}$	303.18	302.94	305.58
$Cl_{C65\%}$	611.77	609.37	614.17

4.1.1 Análisis de los resultados de la evaluación de toxicidad

Según se observa en la Tabla 4.1 para las concentraciones entre 0.000175 mg/L a 0.0175 mg/L el comportamiento es similar en cuanto a la inhibición de crecimiento debido a la baja concentración del fitoestrógeno, por lo que se considera despreciable. Para el rango de concentraciones de 17.5 mg/L, 1.75 mg/L, 0.175 mg/L se visualizó que la isoflavona favorece al crecimiento en las especies vegetales, debido a la actividad agonista de acuerdo con Palou Oliver *et al.*, (2007). Por lo tanto, a medida que se aumentó las concentraciones por medio de acciones antagonistas del fitoestrógeno la inhibición es creciente y se presenta un umbral o rango de inhibición.

En la concentración de 17.5 mg/L se observó la desviación estándar más alta con un valor de 6.8, la cual es el valor máximo de las concentraciones analizadas. Lo que posiblemente se deba a que no existe homogeneidad completa en los bulbos de cebolla. Lo que puede generar que la concentración del fitoestrógeno se comporte como una concentración menor por tener un tamaño más grande el bulbo, así como, se distribuya de una forma diferente en comparación con un bulbo más pequeño. Lo que se sospecha generó un favorecimiento localizado en una sección del sistema radicular y un aumento de crecimiento radicular para el grupo experimental.

La concentración de inhibición media de crecimiento radicular ($CI_{C50\%}$) por el método estadístico es de 74.46 mg/L, la cual presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0.89, valor cercano a 1, lo que asegura la confiabilidad de los datos. La diferencia entre los coeficientes de inhibición gráfico y estadístico es de 33.64%. Lo que probablemente se debe a que mediante el método estadístico se linealizó los valores de concentración y se excluyó a los valores atípicos de inhibición, por lo que se redujo el error del valor estimado gráficamente.

Finalmente, en una investigación realizada por Causil *et al.*, (2017), se observó que para el compuesto hipoclorito de sodio ($NaClO$) se presentó una inhibición de crecimiento radicular de 5 mg/L sobre la especie *Allium cepa*, mientras que la isoflavona de soya mostro una inhibición en la concentración de 74.46 mg/L, lo que

probablemente se debe a la naturaleza del compuesto metabólico, dando como resultado que la concentración fue mayor para la inhibición.

4.2 Resultados de la evaluación de toxicidad del fitoestrógeno isoflavona de soya sobre la especie *Latuca sativa*

Con base a los datos obtenidos experimentalmente en la prueba de toxicidad aguda de la isoflavona de soya, presentados en las Tablas 3.7 y 3.8, se calculó los promedios y porcentaje de inhibición de germinación de semillas utilizando la ecuación 2.2. Adicionalmente, se calculó la desviación estándar, como se muestra en las Tabla 4.3. Los resultados fueron utilizados para realizar las curvas de los porcentajes de inhibición de germinación versus el logaritmo de la concentración de isoflavona de soya, que se muestra en las Figuras 4.3.

Tabla 4.3 Logaritmo de la concentración, promedio de elongación y germinación de semillas en la especie *Latuca sativa*, % de inhibición de germinación y desviación estándar

Concentración de isoflavona de soya	Log concentración	Promedio de elongación de raíces (mm)	Promedio de semillas germinados	IG%	Desviación estándar
Control negativo (Blanco)	-	59.53	55	-	0.58
Control positivo (1750)	3.24	0.00	0	100.00	0.00
175.00	2.24	42.27	27	49.09	2.65
17.50	1.24	57.47	33	60.00	2.65
1.75	0.24	26.60	14	25.45	1.53
0.175	-0.76	39.87	18	32.73	3.00
0.0175	-1.76	55.17	22	40.00	4.04
0.00175	-2.76	45.33	8	14.55	1.53
0.000175	-3.76	28.00	11	20.00	3.06

En las Figuras 4.3 se determinó gráficamente la $CI_{G50\%}$ (Concentración Inhibitoria de germinación correspondiente al 50% de los organismos expuestos). Para lo cual se trazó una recta en el eje de las ordenadas desde el punto que equivale al 50% hasta cortar la curva. Finalmente, se trazó una línea perpendicular hasta cortar con el eje de las abscisas, obteniendo el valor del logaritmo concentración igual a 0.7 que corresponde a la concentración $CI_{G50\%}$ de 5.01 mg/L de isoflavona de soya.

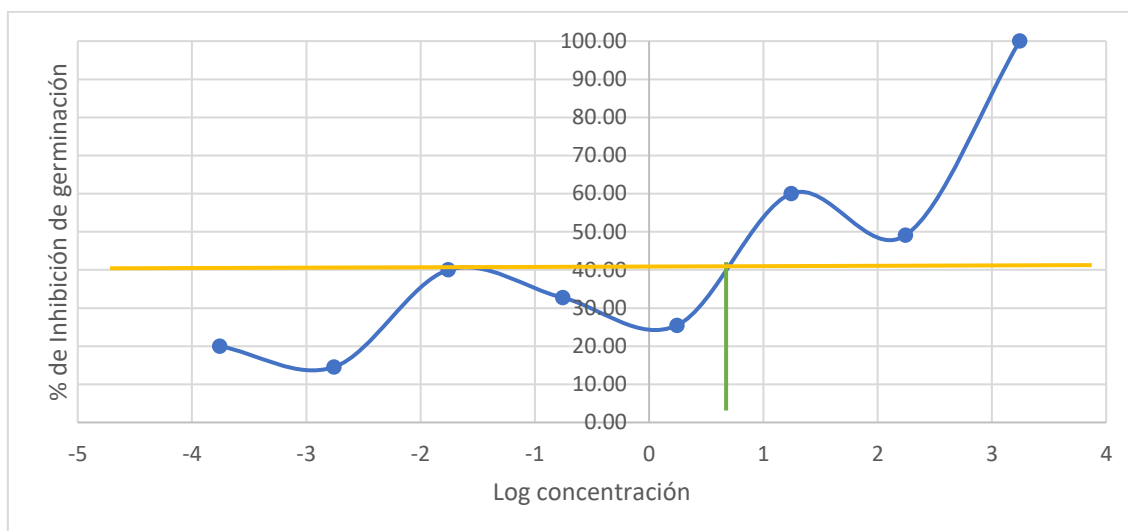


Figura 4.3 Porcentaje de inhibición de germinación vs concentración en la especie *Lатуca sativa* expuesta a la isoflavona de soya

Adicionalmente, para subir la precisión de ($CI_{G50\%}$), en base a los resultados del % de inhibición de germinación de semillas expuestas en las Tablas 4.3, se transformó los porcentajes de inhibición a valores probit por medio de la Tabla 2.4 de Finney. A partir de los valores probit obtenidos versus el logaritmo de la concentración de isoflavona de soya, se obtuvo la gráfica linealizada, así como, la ecuación y el coeficiente de determinación, como se lo muestra en las Figuras 4.4.

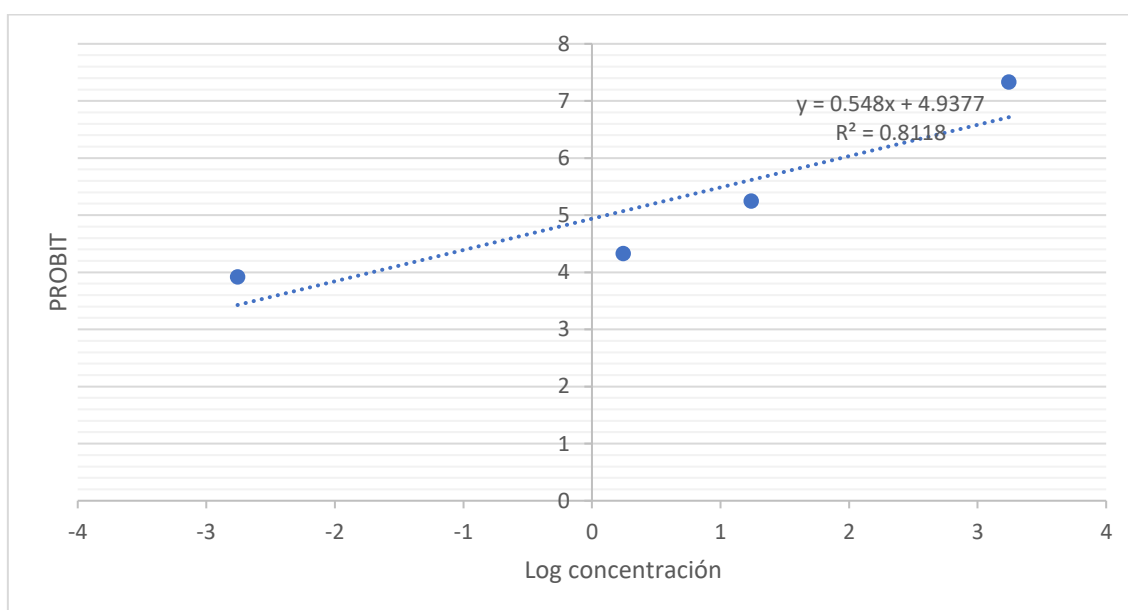


Figura 4.4 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de isoflavona de soya en la especie *Lатуca sativa*

Mediante la ecuación linealizada se determinó la concentración de inhibición media de germinación ($Cl_{G50\%}$) aplicando el método de Finney, (1952), para lo cual se toma en consideración que, (Y) corresponde al valor probit de 5 y para determinar el logaritmo de la concentración de inhibición al 50%, se despejará la variable X de la ecuación. Finalmente, se determinó la inhibición para diferentes porcentajes, así como, sus límites inferiores y superiores a partir de la desviación estándar, como se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 $Cl_{G50\%}$ y límites de confianza para el ensayo de *Latuca sativa* expuestas a la isoflavona de soya por 120 horas

Cl_G	Concentración mg/L	Intervalo de confianza 95%	
		Límite inferior	Límite superior
$Cl_{G35\%}$	0.002	0.000	6.002
$Cl_{G40\%}$	0.019	0.000	6.019
$Cl_{G45\%}$	0.160	0.000	6.160
$Cl_{G50\%}$	1.348	0.100	6.628
$Cl_{G55\%}$	11.365	6.065	16.665
$Cl_{G60\%}$	95.826	90.546	101.106
$Cl_{G65\%}$	807.993	802.713	813.273

4.2. Análisis de resultados de la evaluación de toxicidad

Según se presenta en la Tabla 4.3 para las concentraciones de 0.175 mg/L y 1.75 mg/L se observó que la isoflavona favorece al crecimiento en el organismo de prueba debido a la actividad agonista de acuerdo con Palou Oliver *et al.*, (2007). Por lo tanto, a medida que se aumentó las concentraciones por medio de acciones antagonistas del fitoestrógeno la inhibición es creciente y se presenta un umbral o rango de inhibición.

En la concentración de 0.0175 mg/L se observó la desviación estándar más alta con un valor de 4.04, la cual es el valor máximo de las concentraciones analizadas. Lo que posiblemente se deba a que no existe homogeneidad completa en las semillas de *L. sativa*, lo que posiblemente generó una disminución en la germinación.

La concentración de inhibición media de elongación radicular ($CI_{G50\%}$) por el método estadístico fue de 1.348 mg/L, la cual presentó un coeficiente de determinación de 0.81, valor cercano a 1, lo que asegura la confiabilidad de los datos. Además, se visualizó que el valor gráfico estimado se encuentra dentro del rango de confianza para la concentración de inhibición obtenido estadísticamente. Adicionalmente, mediante el método estadístico se linealizó los valores de concentración y se excluyó a los valores atípicos de inhibición, por lo que se redujo el error del valor estimado gráficamente.

Finalmente, en una investigación realizada por Causil *et al.*, (2017), se observó que para el compuesto hipoclorito de sodio ($NaClO$) se presentó una inhibición de germinación radicular de 17 mg/L sobre la especie *Latuca sativa*, mientras que la isoflavona de soya mostro una concentración de inhibición de 1.348 mg/L, lo que probablemente se debe a la acción antagonista, dando como resultado que a una menor concentración se tiene un mayor % de inhibición.

4.3 Resultados de la evaluación de toxicidad del fitoestrógeno isoflavona de soya sobre la especie *Daphnia magna*

4.3.1 Resultados de la evaluación de toxicidad aguda

Con base a los valores promedio obtenidos experimentalmente en la prueba de toxicidad aguda de la isoflavona de soya expresados en la Tabla 3.11, se calculó el porcentaje de letalidad en base al total de organismos iniciales, así como, la desviación estándar, como se muestra en la Tabla 4.5. Los resultados fueron utilizados para realizar la curva de porcentaje de letalidad vs el logaritmo de la concentración de isoflavona de soya que se muestra en la Figura 4.6

Tabla 4.5 Logaritmo de la concentración, promedio de organismos muertos, porcentaje de letalidad en la especie *Daphnia magna* y desviación estándar

Concentración de isoflavona de soya (mg/L)	Log concentración	Promedio de organismos muertos	% Letalidad	Desviación estándar
Control negativo (Blanco)	-	0	0	0
Control positivo (1750)	3.24	30	100	0
350	2.54	17	56.66	4.58
175	2.24	13	43.33	3.46
17,5	1.24	9	30	3
1,75	0.24	1	3,33	1.73
0,175	0	0	0	0
0,0175	0	0	0	0

La Figura 4.5 se determinó gráficamente la $CL_{50\%}$ (Concentración Letal correspondiente al 50% de los organismos expuestos). Para lo cual se trazó una recta en el eje de las ordenadas, en el que equivale al 50% hasta cortar la curva, para finalmente trazar una línea perpendicular hasta cortar con el eje de las abscisas, obteniendo un valor del logaritmo de la concentración igual a 2.38 que corresponde a la concentración $CL_{50\%}$ de 239.88 mg/L de isoflavona de soya.

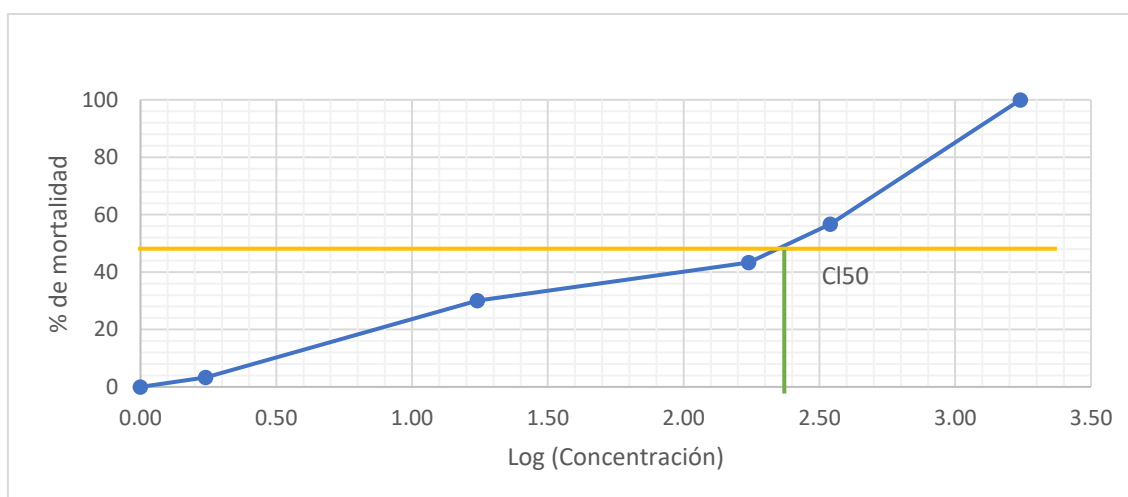


Figura 4.5 Porcentaje de letalidad vs logaritmo de la concentración en la especie *Daphnia magna*

$$CL_{50\%} = 239.883 \text{ mg/L.}$$

Adicionalmente, para subir la precisión de ($CL_{50\%}$), en base a los resultados del % de letalidad expuestos en la Tabla 4.5, se procedió a transformar el porcentaje de letalidad a valores probit por medio de la Tabla 2.4 de Finney. A partir de los resultados probit obtenidos y con los valores del logaritmo de la concentración de isoflavona de soya, se obtuvo la gráfica linealizada, así como, la ecuación y el coeficiente de determinación, como se lo muestra en la Figura 4.6.

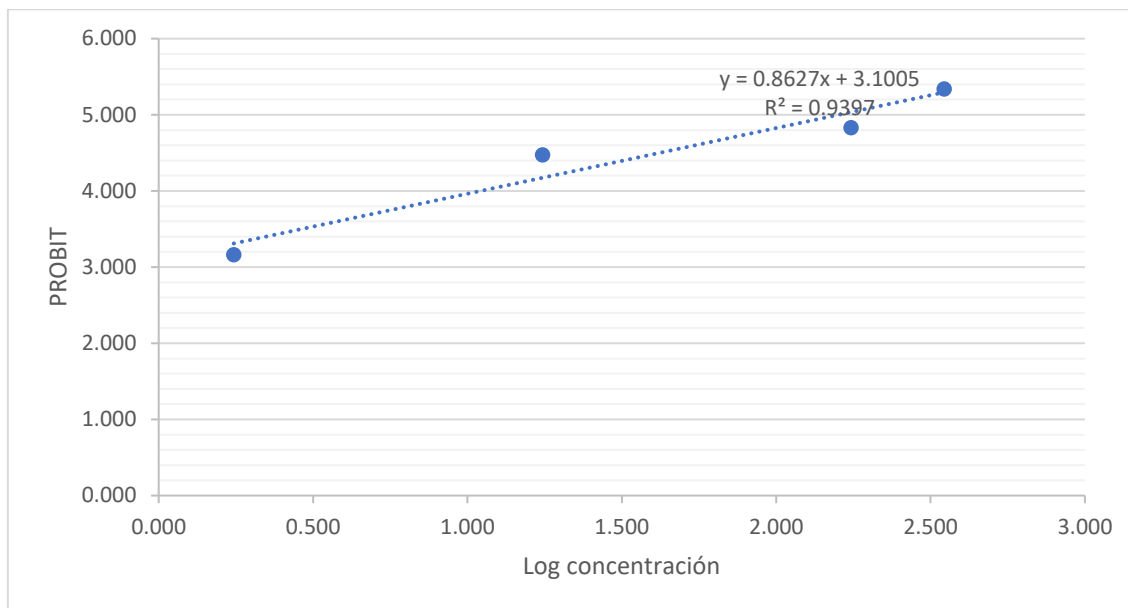


Figura 4.6 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de isoflavona de soya para la especie de *Daphnia magna*

Mediante la ecuación linealizada se determinó las concentraciones de letalidad media ($CL_{50\%}$) aplicando el método de Finney, (1952), para lo cual se toma en consideración que, (Y) corresponde al valor probit de 5 y para determinar el logaritmo de la concentración de inhibición al 50%, se despejará la variable X de la ecuación. Finalmente, se determinó la inhibición para diferentes porcentajes, así como, sus límites inferiores y superiores a partir de la desviación estándar, como se muestra en las Tablas 4.6.

Tabla 4.6 CL_{50%} y límites de confianza para el ensayo de *Daphnia magna* expuestas a la isoflavona de soya por 48 horas

CL	Concentración mg/L	Intervalo de confianza 95%	
		Límite inferior	Límite superior
CL _{35%}	2.92	0	6.38
CL _{40%}	11.13	5.13	17.13
CL _{45%}	42.45	35.53	49.37
CL _{50%}	161.92	155.00	168.84
CL _{55%}	617.59	608.43	626.75

4.3.2 Análisis de resultados de la evaluación de toxicidad

Según se observa en la Tabla 4.5 la curva es creciente y directamente proporcional con la concentración de isoflavona de soya. Este comportamiento de tolerancia de la *D. magna* a la isoflavona podría deberse a la alimentación del organismo de prueba. Dado que el organismos está acostumbrada al consumo de material orgánico vegetal (alfalfa), la cual es un fitoestrógeno, como se lo describe en Taipale *et al.* (2014). Por lo que probablemente la isoflavona de soya no generó letalidad en las concentraciones bajas.

En las concentraciones de 17.5 mg/L, 175 mg/L y 350 mg/L se observó desviaciones altas máximas de 3, 3.46 y 4.58 respectivamente, los cuales con los valores máximos de las concentraciones analizadas. Lo que posiblemente se deba a que no existió homogeneidad completa en los neonatos expuestos, lo que se sospecha genero variación en una unidad por cada grupo experimental.

La concentración de letalidad media (CL_{50%}) fue de 161.92 mg/L, con un límite superior de 168.84 mg/L, la cual presentó un coeficiente determinación (R^2) de 0.93, un valor cercano a 1 y que asegura la confiabilidad de los resultados. Además, se visualizó que en comparación con el valor estimado gráficamente (Figura 4.6), se presenta una diferencia del 32% en comparación con el valor estadístico. Lo que probablemente se deba a que las diluciones seriadas son de 1:10 en cada grupo de prueba, lo que se sospecha afectó a la estimación de letalidad media por el método gráfico. Por lo tanto,

mediante el método estadístico se linealizó los valores de concentración y se excluyó a los valores de letalidad del 0%, lo que redujo el error.

Finalmente, en una investigación realizada por Parada (2019), se observó que para el compuesto extracto etanólico de matico (EMAT) se presentó una letalidad media de 481 mg/L, sobre la especie *Daphnia magna*. En el estudio se utilizó un licuado del extracto de matico para el desarrollo del ensayo. Mientras que la isoflavona de soya usada en el ensayo proviene de un fármaco comercial y mostro una concentración letal media de 161.92 mg/L. Este comportamiento podría deberse a que la isoflavona de soya al ser un medicamento haya estado más purificado, interactuado directamente con el organismo de estudio a comparación con él extracto de matico.

4.4 Análisis comparativo

Tras realizar la prueba estadística de Finney (1952) para los tres organismos se procedió a analizar el gráfico PROBIT versus el logaritmo de la concentración como se puede observar en el Figura 4.7.

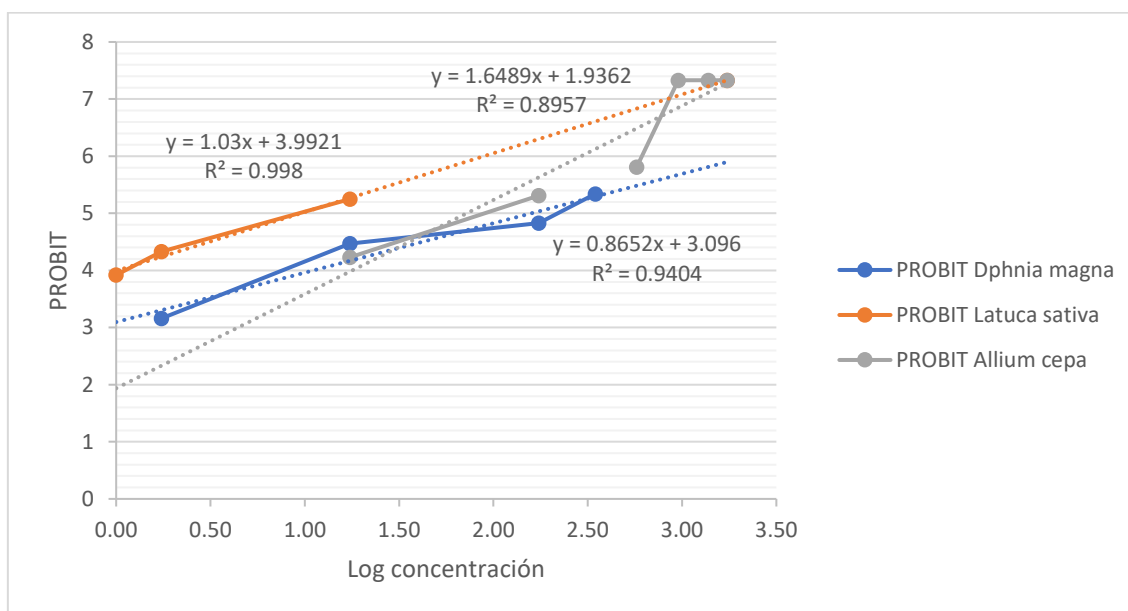


Figura 4.7 PROBIT vs logaritmo de la concentración en (mg/L) de las especies *Allium cepa*, *Lатуca sativa* y *Daphnia magna*

4.4.1 Análisis comparativo de los resultados obtenidos entre los organismos *Allium cepa*, *Latuca sativa* y *Daphnia magna* al exponerlos a diferentes concentraciones de isoflavona de soya

Con los resultados obtenidos estadísticamente de $Cl_{C50\%}$ para la especie *A. cepa* el resultado fue de 74.46 mg/L, para la $Cl_{G50\%}$ sobre la especie *L. sativa* el resultado fue de 1.348 mg/L y la $Cl_{L50\%}$ para la especie *D. magna* fue de 161.92 mg/L. En las tres especies se presentó concentraciones letales y de inhibición diferentes.

Para la especie *D. magna* se observó una alta concentración de letalidad media, lo que probablemente se deba a la composición química de la isoflavona de soya, dado que este es un fitoestrógeno y puede llegar a ser parte de la alimentación del organismo de prueba. Por lo que se evidencio se requiere una alta concentración para llegar a la letalidad en comparación con los organismos vegetales. Para el organismo *A. cepa* se observó una inhibición de crecimiento radicular media en comparación con los otros organismos de prueba. Lo que probablemente se haya dado por la acción agonista del fitoestrógeno, ya que este llegó a favorecer de forma localizada al crecimiento radicular en un cierto rango de concentraciones. Finalmente, para el organismo *L. sativa* se observó valores atípicos para determinadas concentraciones, que se sospecha pudo haberse dado por la falta de homogeneidad en el tamaño de semillas y se observó que en esta especie se presenta la menor concentración de inhibición, dando a entender que es la especie más susceptible frente a la isoflavona de soya.

En base a la Figura 4.7 de valores PROBIT de letalidad o inhibición versus el logaritmo de la concentración en las especies se puede observar que, de las tres especies analizadas, la recta es más pronunciada para la *Latuca sativa* lo que refleja que los organismos presentan inhibición de germinación a una concentración menor, mientras que la especie *Daphnia magna* presentan una recta menos pronunciada lo que significa que la especie es más tolerante.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De los resultados estadísticos obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda para la isoflavona de soya se tiene que la $CL_{50\%}$ fue de 161.92 mg/l para el bioindicador *Daphnia magna*, para el organismo *Allium cepa* la $Cl_{C50\%}$ es de 74.46 mg/l y en para el organismo *Latuca sativa* la $Cl_{G50\%}$ fue de 1.348 mg/l, lo que indica un efecto negativo al someter a altas concentraciones de la isoflavona de soya para todas las especies en cuanto a su desarrollo y crecimiento

Se concluye que para los bioensayos en las pruebas preliminares y definitivas se requiere aumentar el rango de concentraciones para la especie *Allium cepa*, por la ausencia de inhibición en el crecimiento radicular.

En comparación de los resultados estadísticos de inhibición para las especies de origen vegetal, se observa una inhibición negativa en el organismo *A. cepa* para las concentraciones de 17.5 mg/L, 1.75 mg/L y 0.175 mg/L, así como, se visualiza un crecimiento localizado en el sistema radicular, generando una disminución en el número de raíces y aumentando la longitud promedio. Mientras que en el organismo *L. sativa* se observa valores atípicos de concentraciones de inhibición que no llegan a ser superiores al control de prueba (blanco) y este no presenta un rango de concentraciones a la cual la isoflavona de soya actúe de manera favorable como se lo visualizo en la *A. cepa*.

En la especie *Daphnia magna* se concluye que se requiere una concentración alta de isoflavona de soya para causar un efecto letal en el 50% de la población, debido a la naturaleza del fitoestrógeno ya que éste posee características similares a alimentos consumidos por el organismo de estudio.

En comparación con los resultados estadísticos respecto a los coeficientes de determinación (R^2) para los tres organismos de prueba, los resultados son superiores a 0.82, lo que asegura que los valores obtenidos por el método PROBIT son confiables.

En comparación con las tres especies analizadas, se concluye que la recta estadística es más pronunciada para la *Latuca sativa* lo que refleja que los organismos presentan la inhibición de germinación a una concentración menor, mientras que en la especie *Daphnia magna* la recta es menos pronunciada lo que significa que la especie es más tolerante.

5.2 Recomendaciones

Realizar estudios que incluya ensayos toxicológicos aplicados a otras especies vegetales como *Allium fistulosum*, *Mentha x piperita* y *Piper aduncum*, especies usadas en ensayos toxicológicos que permitan evaluar el nivel de toxicidad, así como, la inhibición de crecimiento radicular e inhibición de germinación.

Mejorar la homogeneidad de los organismos de prueba en la especie *Allium cepa* verificando que sean de la misma fuente agrícola o con condiciones exactas de largo, ancho y peso, así como, verificar que las semillas de *Latuca sativa* sean certificadas por el Ministerio de Agricultura.

Mejorar las condiciones de temperatura en el laboratorio tomando en cuenta el encendido y apagado de los equipos dado que genera una variación considerable para el desarrollo de ensayos biológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid) s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of soils and sediments*, 11(2), 281-289.
- Boffelli, E., & Sirtori, G. (2020). *Las lechugas, cultivo, cuidado y consejos prácticos* (De Vecchi).
- Carrasco, J. del C. R., Delgado, C. Y. S., & Cobos, D. F. O. (2017). Contaminantes emergentes y su impacto en la salud. Emerging contaminants and its impact on the health. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca*, 35(2), Article 2.
- Causil, L. A., Coronado, J. L., Donado, K. A., Pacheco, C., Vega, M. F., & Verbel, L. F. (2017). Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L .) Cytotoxic effect of sodium hypochlorite (NaClO) in apical cells of onion roots (*Allium cepa* L .). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1), 97–104.
- Cheban, L., Grynko, O., & Dorosh, I. (2018). Co-cultivation of *Daphnia magna* (Straus) and *Desmodesmus armatus* (chod.) Hegew. In recirculating aquaculture system wastewater. *Fisheries & Aquatic Life*, 26(1), 57–64. <https://doi.org/10.2478/aopf-2018-0007>
- Csaba, G. (2018). Effect of endocrine disruptor phytoestrogens on the immune system: Present and future. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 65(1), 1–14. <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.018>
- Cheban, L., Grynko, O., & Dorosh, I. (2018). Co-cultivation of *Daphnia magna* (Straus) and *Desmodesmus armatus* (chod.) Hegew. In recirculating aquaculture system wastewater. *Fisheries & Aquatic Life*, 26(1), 57–64. <https://doi.org/10.2478/aopf-2018-0007>
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* (Instituto).
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>,
- Dermapharm AG. (2011). *Ficha Técnica Phyto Soya Forte 117,85.*,
- Flores Calvo, F., Garcia, J., & Bobado, J. (2017). *Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties.* Deutsche Nationalbibliothek. https://books.google.com.ec/books?id=Xfs6DwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Fatta Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), 251-275
- Finney, DJ (1952). *Análisis probit: un tratamiento estadístico de la curva de respuesta*

sigmoidea (2ª ed.). Prensa de la Universidad de Cambridge.

- Gulkowska, A., Leung, H. W., So, M. K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L. W., ... & Richardson, B. J. (2014). Removal of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors from water by carbon nanotubes: a review. *Journal of Environmental Management*, 146, 30-44.
- Gomez-Eyles, J. L., Collins, C. D., Hodson, M. E., & Zhang, C. (2013). Are soil test endpoints suitable for assessing risks of engineered nanomaterials in soil?. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(2), 225-239.
- Hüser, S., Guth, S., Joost, H. G., Soukup, S. T., Köhrle, J., Kreienbrock, L., Diel, P., Lachenmeier, D. W., Eisenbrand, G., Vollmer, G., Nöthlings, U., Marko, D., Mally, A., Grune, T., Lehmann, L., Steinberg, P., & Kulling, S. E. (2018). Effects of isoflavones on breast tissue and the thyroid hormone system in humans: A comprehensive safety evaluation. *Archives of Toxicology*, 92(9), 2703–2748. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2279-8>
- Herrero, O., Pérez Martín, J. M., Fernández Freire, P., Carvajal López, L., Peropadre, A., & Hazen, M. J. (2012). Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 743(1), 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.028>
- Jargin, S. V. (2014). Soy and phytoestrogens: Possible side effects. *GMS German Medical Science*, 12, Doc18. <https://doi.org/10.3205/000203>,
- Jiménez, O. (2018). Efecto protector del extracto de flores de *Cordia lutea* Lam. “Flor de overo” ante la toxicidad del mercurocromo en raíces de *Allium cepa* L [Bachelors Degree]. Universidad San Pedro.
- Koçyiğit, M., Salmeri, C., Özhatay, N., Kaya, E., & Brullo, S. (2023). *Allium sphaeronixum* (Amaryllidaceae), A New Species from Turkey. *Plants*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/plants12112074>
- Lee, B.-Y., Choi, B.-S., Kim, M.-S., Park, J. C., Jeong, C.-B., Han, J., & Lee, J.-S. (2019). The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 210, 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.009>
- Mittmann, B., Ungerer, P., Klann, M., Stollewerk, A., & Wolff, C. (2014). Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. *EvoDevo*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-12>,
- Mace, T. A., Ware, M. B., King, S. A., Loftus, S., Farren, M. R., McMichael, E., Scoville, S., Geraghty, C., Young, G., Carson, W. E., Clinton, S. K., & Lesinski, G. B. (2019). Soy isoflavones and their metabolites modulate cytokine-induced natural killer cell function. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41687-z>
- Núñez-Delgado, A., & Arias-Estévez, M. (Eds.). (2022). *Emerging Pollutants in Sewage Sludge and Soils* (Vol. 114). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031->

07609-1

- OCDE. (2013). Directrices de la OCDE para el Ensayo de Productos Químicos. Prueba No. 211: Prueba de Reproducción de *Daphnia magna*,
- Palou Oliver, A., Arboix Arzo, M., Arola, L., & Bladé, C. (2007). Isoflavonas Aesan. Informe Del Comité Científica de La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) En Relación Con Las Consecuencias Asociadas Al Consumo de Isoflavonas, 77–94.
- Parada, M. (2019). Evaluación de la disrupción endocrina y efectos toxicológicos en *Daphnia magna* de un extracto estandarizado de *Buddleja globosa* Hope y de su componente mayoritario (verbascósido). UNIVERSIDAD DE CHILE.
- Pivonello, R., & Diamanti, K. (2023). Environmental Endocrinology and Endocrine Disruptors: Endocrine and Endocrine-targeted Actions and Related Human Diseases. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-39044-0>
- Pabich, M., & Materska, M. (2019). Biological Effect of Soy Isoflavones in the Prevention of Civilization Diseases. *Nutrients*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/nu11071660>,
- Preedy, V. R. (Ed.). (2013). Isoflavones: Chemistry, analysis, function and effects. RSC Publishing.,
- Pereira De Araújo, M., Giovanetti El-Deir, S., & Gomes Tavares, R. (2022). *Lactuca sativa* como bioindicador da contaminação por alumínio do lodo de Estação de Tratamento de Água. *Sistemas & Gestão*, 16(2). <https://doi.org/10.20985/1980-5160.2021.v16n2.1717>
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>
- Rede, D., Santos, L. H. M. L. M., Ramos, S., Oliva-Teles, F., Antão, C., Sousa, S. R., & Delerue-Matos, C. (2019). Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. *Science of The Total Environment*, 673, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.432>,
- Snyder, S. A., Adham, S., Redding, A. M., Cannon, F. S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., ... & Wert, E. C. (2003). Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 157(1-3), 407-420.
- Slikker Jr., W., Andersen, ME, Bogdanffy, MS, Bus, JS, Cohen, SD, Conolly, RB, ... y Tillitt, DE (2004). Transiciones dependientes de la dosis en los mecanismos de toxicidad: estudios de casos. *Ciencias Toxicológicas*, 77(2), 162-171.
- Saetama, V., Vera, L., Vanegas, M. E., Cruzat, C., & Brazales, D. (2018). Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con *Artemia salina*, *Allium schoenoprasum* L y *Lactuca sativa*. *Rev. Toxicol* (2018) 35: 112 - 118, 7.,
- Tang, Y., Yin, M., Yang, W., Li, H., Zhong, Y., Mo, L., Liang, Y., Ma, X., & Sun, X. (2019). Emerging pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk

assessment. *Water Environment Research*, 91(10), 984–991.
<https://doi.org/10.1002/wer.1163>,

- Tkaczyk, A., Bownik, A., Dudka, J., Kowal, K., & Ślaska, B. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of The Total Environment*, 763, 143038. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143038>
- Taipale, S. J., Brett, M. T., Hahn, M. W., Martin-Creuzburg, D., Yeung, S., Hiltunen, M., Strandberg, U., & Kankaala, P. (2014). Differing *Daphnia magna* assimilation efficiencies for terrestrial, bacterial, and algal carbon and fatty acids. *Ecology*, 95(2), 563–576. <https://doi.org/10.1890/13-0650.1>
- USEPA. (2002). Métodos a corto plazo para estimar la toxicidad crónica de efluentes y aguas receptoras para los organismos de agua dulce
- Vasilachi, I. C., Asimincesei, D. M., Fertu, D. I., & Gavrilesco, M. (2021). Occurrence and Fate of Emerging Pollutants in Water Environment and Options for Their Removal. *Water*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/w13020181>,
- Wang, J., Wang, S. A., Wang, B. Z., Lin, K. F., Sun, Q. R., & Guo, X. M. (2015). Sorption behavior and mechanisms of perfluorinated compounds on sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 343-354.
- Wheeler, JR, Basu, N., Halbrook, RS, Newman, J. y Burkhard, LP (2002). Toxicidad del dicromato de potasio para *Hyaella azteca*. *Toxicología y química ambiental*, 21(10), 2120-2125