



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

EFFECTOS SUBLETALES EN LOS MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS
Nectopsyche (Leptoceridae) DE LAS AGUAS ACIDIFICADAS POR LA MINERÍA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera Ambiental en Prevención y Remediación

Profesor guía

Dr. Christian Patricio Villamarín Flores

Autora

Nicole Carolina Cerón Moncayo

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Efectos subletales en los macroinvertebrados acuáticos Nectopsyche (Leptoceridae) de las aguas acidificadas por la minería, de Nicole Carolina Cerón Moncayo, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Christian Patricio Villamarín Flores

Doctor en Ecología Fundamental y Aplicada

C.C.:1002339404

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Efectos subletales en los macroinvertebrados acuáticos Nectopsyche (Leptoceridae) de las aguas acidificadas por la minería, de Nicole Carolina Cerón Moncayo, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Indira Fernandina Black Solís

Máster en Conservación y Gestión del Medio Natural

C.C.171127356-3

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Nicole Carolina Cerón Moncayo

C.C. 175030198-6

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, y a mi familia por el apoyo brindado a lo largo de mi vida, y por siempre creer en mí.

Quiero agradecer a los profesores Christian Villamarín e Indira Black por los conocimientos impartidos entorno a mi vida profesional y por la orientación para concluir el presente trabajo con éxito.

A Juan Manuel, Angie y Marquito por acompañarme en este proceso.

DEDICATORIA

A toda mi familia, en especial a mis padres, Fernando y María Leticia, y a mi hermana María Paz por el gran amor que nos une.

RESUMEN

Muchos de los cuerpos de agua dulce se ven afectados por las actividades humanas, sobre todo por descargas ácidas de la actividad minera. Descargas que tienen un alto contenido de metales pesados como el arsénico. En el presente estudio se realizaron pruebas de exposición a diferentes concentraciones de arsénico a individuos del género *Nectopsyche*, los cuales presentan características óptimas para trabajar a nivel de laboratorio. Se utilizó un control, una concentración baja de 0,05 mg/L, una media de 0,1 mg/L (máximo permisible de la norma ecuatoriana) y una concentración alta de 0,5 mg/L. El período de experimentación fue de 5 días. Se midieron parámetros fisicoquímicos cada 12 horas, en donde se registró un aumento de la temperatura y por lo tanto la disminución de oxígeno disuelto e incremento de la conductividad. Se evidenció una disminución de pH en la concentración más alta de 0,5 mg/L de As. Se realizaron mediciones del metal al inicio y al final de la experimentación, y se determinó que sus variaciones son muy cercanas. El medio, al tornarse más ácido, provocó la muerte de algunos individuos a partir del segundo día; el resto de los individuos presentaron disminución de la actividad locomotora a medida que avanzaba el tiempo de experimentación. Al finalizar el quinto día de ensayo los organismos vivos fueron preservados en frío (-80°C) para realizar las pruebas de biomarcadores. Los organismos presentaron menor actividad enzimática en las concentraciones mayores del metal pesado debido a que este fue empleado para reducir el estrés oxidativo. En conclusión, a una mayor concentración de arsénico se obtuvo un pH menor. Además, en las concentraciones 2 y 3 se presentaron los niveles más bajos de movilidad y el mayor índice de mortalidad. Las respuestas bioquímicas de los individuos fueron favorable al estrés, en las concentraciones más altas presentaron un mayor consumo de las enzimas como medio de protección de sus tejidos, a diferencia del control en donde no fue necesaria debido a que el medio no fue intervenido.

ABSTRACT

Many fresh water bodies are being affected because of human activities, especially by acid drainages from mining. Drainages that have a high content of heavy metals such as arsenic. In the present study exposure tests were done with different arsenic concentrations to individuals of the genus *Nectopsyche*, which have suitable characteristics to work at a laboratory level. The treatments that were used are a control, a low concentration of 0,05 mg/L, a moderate concentration of 0,1 mg/L (Ecuadorian norm's maximum allowable) and a higher concentration of 0,5 mg/L. It was a 5 days experimentation period. Physicochemical parameters were measured every 12 hours, where it was registered an increase of temperature and therefore the decrease of dissolved oxygen and the conductivity increase. It was reported a lower pH in the highest arsenic concentration of 0,5 mg/L. Metal measures were done at the beginning and at the end of the experimentation phase, and it was determined that the initial and final results had very close variations. Because of the environment became acid, it caused the death of some individuals since the second day; the rest presented a loss of normal mobility levels as the experimentation time happened. At the fifth day the organisms that were alive were preserved in cold (-80°C) in order to make biomarker tests. The genus *Nectopsyche* individuals had a lower enzymatic activity in the highest heavy metal concentrations because it was used to reduce oxidative stress. In conclusion the higher the concentration of arsenic, the lower the pH was. Furthermore, in concentrations 2 and 3 the lowest levels of mobility and the highest levels of mortality were showed. Biochemical responses had a favorable impact on stress, at the highest concentrations there were a higher enzymes consumption as a way to protect their tissues from damage, unlike the control where it was not necessary due to the fact that the control environment was not intervened.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Antecedentes.....	1
1.2.	Alcance.....	6
1.3.	Justificación.....	6
1.4.	Objetivos.....	8
1.4.1.	Objetivo General.....	8
1.4.2.	Objetivos Específicos.....	8
1.5.	Hipótesis.....	8
2.	MARCO TEÓRICO.....	9
2.1.	Contaminación del agua.....	9
2.2.	Contaminación por actividad minera.....	10
2.2.1.	Metales pesados.....	11
2.2.2.	Acidificación.....	13
2.3.	Efecto de la contaminación minera en la salud y en la biodiversidad en Ecuador.....	14
2.4.	Efectos del agua con metales pesados de la explotación minera sobre la biota.....	15
2.5.	Estudios ecotoxicológicos de afectaciones por metales pesados.....	15
2.5.1.	Ecotoxicología y Características de organismos para estudios ecotoxicológicos.....	16
2.6.	Mediciones en estudios ecotoxicológicos.....	17
2.6.1.	Mediciones letales y subletales.....	17
2.6.2.	Biomarcadores.....	18
2.7.	Macroinvertebrados.....	19
2.7.1.	<i>Nectopsyche</i> (Leptoceridae).....	20
3.	METODOLOGÍA.....	21
3.1.	Muestreo.....	21
3.1.1.	Agua y sedimento.....	21
3.2.	Análisis de laboratorio.....	22
3.2.1.	Determinación de metales pesados en agua y suelo.....	22
3.3.	Pruebas de pH.....	22
3.4.	Experimentación.....	23
3.4.1.	Recolección de individuos de <i>Nectopsyche</i>	23
3.4.2.	Simulación del medio.....	24

3.4.2.1. Microcosmos	24
3.4.2.2. Alimento	25
3.4.3. Cambios subletales en macroinvertebrados acuáticos	
<i>Nectopsyche</i> (Leptoceridae)	26
3.4.3.1. Medición de parámetros fisicoquímicos	26
3.4.3.2. Medición de parámetros biológicos	27
3.5. Análisis de metales pesados	27
3.6. Análisis de respuesta bioquímica a los contaminantes	27
3.6.1. Biomarcadores	28
3.7. Análisis de datos	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Resultados.....	30
4.1.1. Parámetros fisicoquímicos.....	30
4.1.1.1. Temperatura	30
4.1.1.2. Conductividad	31
4.1.1.3. Oxígeno disuelto	32
4.1.1.4. Pruebas de Arsénico.....	33
4.1.2. Mortalidad.....	35
4.1.3. Movilidad	36
4.1.4. Biomarcadores	37
4.1.4.1. Catalasa.....	37
4.1.4.2. Glutation.....	38
4.1.4.3. Grupo -sh.....	39
4.2. Discusión.....	40
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1 Conclusiones	43
5.2 Recomendaciones	44
REFERENCIAS.....	45
ANEXOS	59

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La minería es una de las actividades económicas con más antigüedad en la historia, que ha brindado desarrollo económico a distintos países. Es una fuente que genera un alto flujo de ingresos a las naciones (MMSD, 2002). En tiempos de colonia, en cuestiones políticas, dos metales sobresalen como los actores principales, el oro y la plata. Estos fueron una de las razones que impulsaron la conquista española (Angiorama y Becerra, 2010).

Desde entonces el sector minero se ha potencializado con el tiempo, incluso muchos países han recibido asistencia técnica por parte del Banco Mundial, exactamente desde el año 1988. Con el objetivo de contribuir con la inversión minera. La minería ha llevado a los países a tales niveles de desarrollo que se encontraron con la necesidad de adoptar leyes para dicha actividad. Ya que así pueden conseguir la atención de empresas privadas que muestren interés por apoyar estos proyectos (Banco Mundial, 2013).

Por esta razón, los gobiernos han tomado en cuenta tanto aspectos sociales como ambientales; con un enfoque de responsabilidad (Carmona-García, Cardona-Trujillo, y Restrepo-Tarquino, 2017). Y durante los últimos años se han ido modificando leyes y políticas, con respecto a la minería, la cual ha logrado ser sujeto de cambios, además es esencial, si de asistencia técnica se trata, el desarrollo de disposiciones ambientales adecuadas. A pesar de que existen reglamentos para proceder, muchas empresas no lo cumplen, buscando solamente el fin lucrativo. Así como es uno de los pilares que ayuda a mantener la economía más estable de algunos países, puede traer consecuencias al medio ambiente, consecuencias de índole negativa. Y más si es un tema que se podría convertir en un medio único de generación de ingresos (Banco Mundial, 2013).

Entre los productos que se obtienen, están minerales metálicos y no metálicos, los primeros son explotados con el fin de obtener el elemento o metal. Se clasifican en metales preciosos como la plata, el oro; metales siderúrgicos como el hierro, cobalto, cromo, níquel; metales ligeros como el aluminio; metales básicos como el plomo, zinc, cobre y metales nucleares como el uranio. Por otro lado, están los no metálicos. Estos son aprovechados con un objetivo diferente al de conseguir metales. Hay minerales industriales como el cuarzo, potasio, sal, feldespato, fosfatos; materiales para construir como arcilla, grava, caliza, arena, también hay gemas semi preciosas como la perla, jade, gemas preciosas como esmeraldas, diamantes (Banco Central del Ecuador, 2014).

La mala calidad o pérdida de los servicios ambientales está dada por las diferentes actividades antrópicas que existen, no obstante, la minería es una de las actividades que produce un mayor cambio en el medio. Causa efectos sobre la salud pública y de los geoecosistemas. Los impactos se dan en cada uno de los componentes. En el componente flora ocurre la disminución de la vegetación. En la fauna acuática, se da la migración de especies, alteración del hábitat, disminución de especies por muerte. En el componente agua ocurre la pérdida de su capacidad neutralizante y contaminación química, el suelo se erosiona y ocurre el hundimiento del terreno, y al aire se emiten gases que lo contaminan. Se habla de una pérdida de estos servicios al no permitir su pleno aprovechamiento (López, López, Medina, 2017). Uno de los más grandes problemas que ha traído la minería es el de acidificación, principalmente a los cuerpos de agua naturales en donde se realizan sus descargas. En varios países del mundo han realizado diferentes estudios acerca de la acidificación de cuerpos de agua. Y uno de los motivos con los que se le ha relacionado ha sido las descargas industriales. Principalmente descargas de minería por los metales pesados que contiene. La acidificación no es causada por la simple presencia de estos metales, sino porque ellos captan los grupos hidroxilos (OH), dando paso a la formación de hidróxidos que son insolubles. Ocurre debido a que después de la ionización con el agua, están cargados positivamente, de esta manera atraen pares de electrones de moléculas de agua. Esta fuerza de

atracción incrementa con la carga y para iones con radio iónico más pequeño es más potente. Después, la densidad electrónica es recibida en el metal desde el átomo de oxígeno haciendo que los OH se vuelvan polares y las moléculas de agua se tornen ácidas, mucho más que las que están en solución. El ión metálico, entonces, es la fuente de protones actuando junto a los iones de hidroxilo que están en la solución (Massol, 2018). Depende mucho también de la ubicación, ya que en los lugares cercanos a las descargas ácidas existe variación en parámetros como oxígeno disuelto que disminuye al estar en un medio ácido, y variación en las temperaturas que se ven reflejadas en pH bajos, en estas áreas los minerales ácidos sobrepasan el nivel de los alcalinos (Aduvire, 2006).

La forma en que se afirma que hay acidificación en el agua es por el cambio de pH por metales pesados gracias a la extracción minera, resultando en varias consecuencias sobre el medio y sobre los animales (Pedrozo, Díaz, Temporetti, Baffico, y Beamud, 2010). Estudios han sido realizados acerca de cambios ocurridos en peces, crustáceos, y en macroinvertebrados, acerca de la disminución en su tasa de crecimiento, y aumento o disminución en la densidad poblacional, según el nivel de acidificación que existe en el medio en el que viven. Entre los efectos que causa la acidificación está la muerte de los individuos que habitan en el ecosistema, variaciones morfológicas que se presentan con el tiempo, como, deformidades bucales, deformidades en la cápsula de la cabeza, y cuerpo en general (Aduvire, 2006).

La minería en América Latina es conocida por ser practicada de forma rudimentaria, no en todos los países, pero si se habla de la mayoría, se sabe que se realiza en un máximo de veinte hectáreas y no supera la producción de cinco toneladas por trabajador en un día. Y lo que ocurre es que en algunos países son obligadas a seguir reglamentos y normas destinadas a la minería a gran escala, lo que quiere decir que no ajustan sus límites de descarga y vertidos a su realidad, generando problemas ambientales graves (Güiza-Suárez, 2014). Es por esto que en esta área geográfica se han venido realizando investigaciones

al respecto. Por ejemplo, en el caso de Perú se hizo un estudio acerca de los medios acuáticos influenciados por la actividad minera, principalmente con mercurio, plomo y cadmio, en donde se evaluó la concentración letal 50 en macroinvertebrados con los que trabajaron, es decir, la concentración de los metales que mató a la mitad de los individuos. No se han hecho evaluaciones a nivel de cambios morfológicos en cuestiones de disminución de pH o acidificación (Iannacone Oliver, Salazar Capcha y Alvariño Flores, 2003).

La minería en Ecuador comienza desde tiempo antes de la colonia. Empezaron a trabajar ya con extracción de oro, cobre y plata para ceremonias o rituales, ofrendas y comercio, por ejemplo, en la cultura Cañaris y Tolita. Desde ese entonces las más grandes áreas mineras han sido Zaruma seguido por Portovelo y Nambija (Antonio, 2017).

En el país la minería se encuentra dividida en cuatro tipos; minería artesanal, pequeña minería, mediana minería, y finalmente minería a gran escala. Esta división depende de la producción diaria de cada mina. Se realiza minería de superficie y subterránea, minería por paredones, aluvial (Banco Central del Ecuador, 2014). Están comprendidas por las etapas de prospección, exploración, preparación y explotación. En la prospección se identifican lugares a ser explotados, esto lo realiza el estado, o la empresa privada. La exploración tiene que ver con la evaluación del material que se encuentra en el lugar, y la cantidad. La preparación del lugar tiene que ver todo en cuanto a infraestructura se trate, para lograr condiciones operativas, y finalmente en la explotación se ponen en marcha las actividades (Sironi, 2013).

Se sabe que los metales más explotados en el territorio ecuatoriano son en la zona norte el zinc y el cobre, en el centro molibdeno, zinc y cobre, y en el sur hay cantidades altas de plata, cobre, molibdeno, oro y plomo (Ministerio de Minería, 2018). Esta práctica produce elementos que son tóxicos para el ambiente, principalmente porque se emplea mercurio para su obtención. Al ser liberado, puede tomar varias formas, entre ellas están el mercurio metálico, mercúrico y mercurioso, es decir, en diferentes estados de oxidación, compuestos organomercúricos, que al llegar a cuerpos de agua inmediatamente

se solubilizan si hay presencia de carbón orgánico causando alta contaminación. Existen por otro lado los compuestos alquilmercúricos que llegan a cuerpos de agua por escorrentía (Lombardero Rodil, 2000). Las investigaciones en el país no se han enfocado en los cambios morfológicos o variaciones a nivel de poblaciones relacionado con la acidificación causada por la presencia de metales pesados por descargas de minería a cuerpos de agua dulce.

Para la experimentación a campo abierto se mantiene una metodología de muestreo en varios períodos o estaciones del año, debido a que unas son más secas que otras, más húmedas y también puede variar la intensidad de las lluvias; de igual manera se realiza en diferentes puntos de muestreo, y se trabajan con varias especies, pero para esto es necesario la evaluación general de la salud de los ecosistemas. Es primordial que se realicen mediciones sobre todo de las variables fisicoquímicas, ya que pueden ayudar a conocer las cantidades de los elementos presentes, por ejemplo, sales o metales, con los que se va a trabajar. Esto debe ser realizado porque es indiferente cuán mínima es la cantidad o concentración de estos elementos, siempre van a causar variaciones biológicas. Estas prácticas han sido ejecutadas en Europa, América del Norte y América del Sur, ciertas zonas de África por razones tanto de investigación, como por aumento de actividades que generan descargas a cuerpos de agua dulce con alto contenido de elementos tóxicos, además con el fin de incrementar instrumentos de biomonitoreo, levantamiento de líneas base y programas que lo apoyen (Arimoro, Auta, Odume, Keke, y Mohammed, 2018).

Los macroinvertebrados, son comúnmente utilizados para evaluar la calidad de medios acuáticos, como los ríos. Una de las razones principales es que tienen órdenes como los Plecoptera, Ephemeroptera, y Trichoptera que en términos de riqueza y abundancia poseen una mayor representación (Walteros Rodríguez, Castaño Rojas, y Marulanda Gómez, 2016). Otra de las razones por las que han sido utilizados en diferentes estudios es por su gran sensibilidad a los cambios que ocurren en el hábitat, cambios como variación en los parámetros fisicoquímicos, presencia de diferentes concentraciones de metales, alteración

del medio en general, según el tiempo que transcurra y la intensidad. Las variables que han sido sujeto de mayor estudio son la densidad de la población, la estructura de comunidades y diversidad del hábitat. Por el rol que cumplen los insectos acuáticos como indicadores de la calidad de agua, específicamente, agua dulce, en países del norte se han utilizado en investigaciones para evaluar ciertos niveles de contaminación empleándolos como bioindicadores de toxicidad (Ringuelet, 1999).

1.2. Alcance

La presente investigación pretendió estudiar los efectos subletales, movilidad y biomarcadores (catalasa, glutatión, grupo -SH); y efectos letales en los macroinvertebrados acuáticos del género *Nectopsyche* (Leptoceridae) frente a un gradiente de concentración de arsénico. El trabajo se realizó a escala de laboratorio con simulaciones de ríos (microcosmos). Para cada unidad experimental se emplearon diferentes concentraciones de arsénico, las cuales se determinaron en dependencia de los valores registrados en ríos con descargas de la actividad minera.

1.3. Justificación

La minería es una actividad que genera grandes problemas sociales y ambientales, principalmente porque en muchos países hay minería ilegal, como es el caso de Ecuador (Ministerio de Hidrocarburos, 2018). Al ser una actividad ilícita se dan ciertas irregularidades que la hace altamente peligrosa, porque al no ser regulada genera emisiones a la atmósfera y descargas a cuerpos de agua sin respetar la normativa ambiental vigente. Ocurre debido a que los seres humanos tienen la necesidad de construir una base económica para subsistir (Secretaría de Educación Superior, Ciencia, 2015). A pesar de esto el país es uno de los pocos en América Latina que ha empezado a tomar cartas en el asunto con ayuda de su Código Orgánico Integral Penal, en donde se establece como delito cualquier tipo de extracción de mineral dentro del territorio que no

tenga una previa autorización de la autoridad competente (Ministerio de Hidrocarburos, 2018).

En Ecuador, los estudios acerca de los efectos del agua de minería sobre cuerpos hídricos no son abundantes. (Bonilla Martínez, 2010). La investigación acerca de la acidificación del agua en el país ha sido abordada más a nivel de océanos con ayuda de mesocosmos, que son laboratorios que permiten replicar sus condiciones, pero también es necesario que sea estudiado desde los cuerpos de agua en donde ocurren las descargas directamente de la actividad minera, como lo son los cuerpos de agua dulce (Secretaría de Educación Superior, Ciencia, 2015).

Entre los problemas que pueden causar las descargas está el aumento de pH o salinización, disminución del pH o acidificación, lo que conlleva a pérdida de los servicios ambientales, problemas en la salud pública, alteraciones en el hábitat, disminución y migración de las especies (López, López, Medina, 2017). Un gran inconveniente es que la actividad de por sí ya genera grandes volúmenes de descargas ácidas (Escobar-Briones, 2011). Estas tienen un alto potencial de solubilización, además se pueden encontrar elementos como metales, que no surgieron de la descarga de minería, sino que ya estaban presentes en el medio de forma natural y que por la disminución del pH aumentan su concentración (Massol, 2018). Lo que ocurre posterior a esto es la formación de gradientes de concentración de dichos metales pesados como plomo, cadmio, cobre, arsénico a lo largo de la mina y por lo tanto la formación de un gradiente de acidificación. El que se genere un medio de pH bajo ayuda a que persista una disolución de los elementos existentes, provocando aún más un entorno de mayores concentraciones (Pedrozo F, Díaz M, Temporetti P, 2010).

El agua es un elemento fundamental en el desarrollo de la vida de los seres humanos por regulación climática, servicios de abastecimiento a las poblaciones, uso secundario como actividades de pesca, uso pecuario, agrícola, entre otros

(Almazán, Almazán, Carreto, Hernández, Damián, Almazán, 2016). Por lo tanto, es esencial prevenir su contaminación y disminuir su uso, primero conociendo el trasfondo de la actividad que la causa y los efectos que puede tener sobre la salud de las personas, los ecosistemas y el medio ambiente en general. Es importante que las actividades humanas de cualquier tipo tengan una relación estrecha con un medioambiente seguro y sano (Krecek, Horická, 2006). Es por lo tanto un tema que debe ser abordado dentro del área investigativa del país, sobre todo por el gran potencial minero que tiene, lo que genera altos niveles de contaminación y deterioro de los ecosistemas, y con esto la pérdida de calidad de agua de consumo para los seres humanos (Banco Central del Ecuador, 2014).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Evaluar los efectos subletales en macroinvertebrados acuáticos por la acidificación del agua por minería.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar la influencia de las distintas concentraciones de metales pesados sobre el pH.
- Identificar cambios subletales en los macroinvertebrados acuáticos.

1.5. Hipótesis

H01: El incremento de las concentraciones de arsénico no disminuyen el pH del medio.

H11: El incremento de las concentraciones de arsénico disminuyen el pH del medio.

H02: El incremento de las concentraciones de arsénico no generan efectos subletales en individuos de *Nectopsyche*.

H12: El incremento de las concentraciones de arsénico generan efectos subletales en individuos de *Nectopsyche*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Contaminación del agua

La contaminación del agua es un tema que se lo empieza a tratar y a plantear de una manera mucho más seria y objetiva en el año 1972. Se propuso que era directamente proporcional al nivel de desarrollo e industrialización de los países. Aquellos con un tipo de contaminación química son países de alto nivel de actividades industriales, y aquellos con contaminación microbiana son países en vías de desarrollo. Esto no quiere decir que países de bajos recursos no posean el tipo de contaminación química, esto es debido a elementos químicos utilizados en agricultura, industria y minería. En este mismo año este tema empieza a ser plasmado en la política, con el objetivo de que este sea considerado como un componente transversal y por lo tanto sea tomado en cuenta en diferentes áreas y sectores de interés (Mendizabal, 2010). Esto ocurre pensando en todo lo que puede llegar a proveer el recurso, y todos los usos que a este se le puede dar para el desarrollo de la vida, la salud, para responder al derecho humano de disponer de agua con el fin de llevar una vida digna y para cumplir con el resto de los derechos humanos (WHO, 2019).

La contaminación de agua puede provenir de vertidos de hospitales y sus desechos, surfactantes, productos de tratamiento de agua, aditivos de industria y alimentarios, retardantes de fuego, hidrocarburos, minería, entre otros.

Causando variación en las características fisicoquímicas y organolépticas del agua. Esto puede provocar daños a la salud pública de las personas, rechazo en su consumo, e impactos negativos sobre los ecosistemas, su biota y el medio en general. Su contaminación puede ocurrir de forma puntual y de forma sistemática, es decir, por la presencia del contaminante de forma natural o involuntaria y por descargas voluntarias respectivamente; y las fuentes pueden ser múltiples o simples (Prieto Díaz, de Villa Pérez, 1999).

La contaminación del agua se debe a varios factores uno de ellos y el más importante son las actividades antropogénicas. Ya que muchas de ellas causan vertidos no controlados. Y para evaluar la calidad de estas aguas, que se ve altamente afectada, se utilizan ciertos parámetros como son la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales SST, sustancias peligrosas y metales pesados (Gil, Soto, Usma, Gutiérrez, 2012).

El estado de la calidad de agua en el Ecuador, específicamente, se ve perjudicada por los asentamientos de la población, disposición inadecuada de los residuos sólidos, uso de agroquímicos y sobre todo vertimiento de aguas residuales fuera de norma. Las actividades más comunes que se llevan a cabo son crianza de animales, agricultura y generación de sus residuos, actividad petrolera, y minera, reflejando incluso problemas para la salud de las personas. Siendo los más afectados la población pobre, los bajos ingresos les hace vulnerables ya que los costos de asistencia médica son bastante altos. La falta de una buena planificación por entidades de gobierno da paso a que el país tenga altos niveles de contaminación hídrica (SENAGUA, 2012).

2.2. Contaminación por actividad minera

La actividad minera normalmente aporta, desde los inicios de su práctica, con la economía de los países, que está en beneficio de algunos sectores y de una minoría de la población. Siempre existe el alza de precios de los minerales de

extracción por lo que muchas empresas que se dedican a esto, se permiten abandonar los campamentos en donde desarrollan la actividad, dejando de lado cualquier tipo de planificación, de cierre y disposición adecuada de los desechos generados. Esto provoca un gran deterioro ambiental para la atmósfera y para el recurso agua, afectando así a personas y a la biota en general flora y fauna. Las descargas de minería se las hacen a cuerpos de agua dulce o ríos. Los cuales viajan cientos de kilómetros formando nuevos cuerpos de agua al unirse con otros, esto da paso a que personas que no viven cerca del lugar de influencia de zonas de extracción hagan uso de estas aguas por desconocimiento de los elementos presentes en ella, aumentando el porcentaje de población expuesta. Así se arriesga de manera crítica la salud de las personas, el estado de la flora y fauna acuática y terrestre (Aparicio, 2009).

La minería de oro en el Ecuador está ubicada en sectores de la Cordillera de Chilla, en Zaruma, Atahualpa, Piñas, provincias al sur del país y contamina el recurso hídrico con sólidos en suspensión, mercurio y cianuro. Pero la minería ilegal se ha extendido a provincias del norte, como Esmeraldas en sectores como San Lorenzo y Eloy Alfaro, en el Estero María, de igual manera a provincias como Imbabura y Pichincha. El cambio de estas aguas ha sido notorio por la variación de color y turbidez (SENAGUA, 2012).

2.2.1. Metales pesados

La actividad minera es característica por sus vertidos con alto contenido de metales pesados los cuales pueden ser nocivos para la salud (Tabla 1). Sobre todo, en la minería ilegal y en la artesanal, lo cual provoca altos niveles de contaminación y daña los cuerpos de agua. Existe la fase de la extracción de los minerales y la fase de procesamiento, esto ocurre en lugares llamados “plantas de procesamiento”. En ellas ocurre el enriquecimiento del mineral, primero es reducido en los molinos, y luego pasa a la parte de lixiviación. Un metal muy común que se emplea durante la extracción y está presente en piscinas de

lixiviación es en cianuro. Y los desechos con este elemento son descargados en ríos y debido a que son altamente tóxicos generan importantes impactos ambientales. En la mayoría de las ocasiones los vertidos sobrepasan las normas impuestas en cada país convirtiéndose esto una alerta por los daños que puede causar a la población, flora y fauna (Oviedo-Anchundia, Moína-Quimí, Naranjo-Morán, Barcos-Arias, 2017).

La exposición a metales pesados puede generar:

Tabla 1.

Efectos de metales pesados

Personas	Flora	Fauna
<ul style="list-style-type: none"> • Hiperactividad • Menor coeficiente intelectual • Deformaciones óseas • Reducción de capacidad motora 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de especies • Reducción de cobertura vegetal • Erosión de los suelos 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de especies • Reducción de individuos • Alta bioacumulación de metales pesados

Adaptado de Aparicio, 2009.

Existe una mayor probabilidad de ingreso por parte de estos metales a humanos y animales en las épocas de verano, en donde la lluvia no es recurrente, y la probabilidad disminuye en temporada de invierno, ya que facilita su disolución (Oviedo-Anchundia, Moína-Quimí, Naranjo-Morán, Barcos-Arias, 2017).

En el Ecuador existe una norma denominada TULSMA que es el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente que determina en su tabla 12 "Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce" las máximas concentraciones de metales pesados que pueden ser descargados a cuerpos de agua dulce como se muestra a continuación.

Tabla 2.

Límite de descarga de metales pesados a cuerpos de agua dulce.

Parámetro	Límite máximo permisible	Unidades
• Arsénico Total	• 0,1	• mg/l
• Bario	• 2,0	• mg/l
• Cadmio	• 0,02	• mg/l
• Cobre	• 1,0	• mg/l
• Níquel	• 2,0	• mg/l
• Hierro Total	• 10,0	• mg/l

Adaptado de Ministerio del Ambiente, 2016.

En el caso del metal pesado arsénico, presente en un medio acuático, puede causar los primeros síntomas sobre los individuos de una población durante los primeros 3 días después de la exposición. Causando paralización, descoordinación, ceguera y muerte (Londoño-Franco, Londoño-Muñoz, Muñoz-García, 2016).

2.2.2. Acidificación

La acidificación es un descenso del pH, y el pH es una medida para determinar la cantidad de iones hidroxilo y de hidrógeno libre en el agua, y determinar si el medio es básico (mayor cantidad de iones hidroxilo libre) o ácido (mayor cantidad de hidrógeno libre). Se tiene un rango de 0 a 14, un pH mayor a 7 que es un neutro se denomina básico, y un pH menor a 7 se denomina ácido. La toxicidad de los metales pesados está dada por su solubilidad. Esto quiere decir que entre más bajo sea el pH el metal va a ser más tóxico, y esto ocurre porque son más solubles. Es un hecho que el agua de drenaje de una mina es alrededor de 100.000 veces más ácido que un agua neutra, por sus pH que suelen tener valores de 2 (USGS, 2018)

Este es uno de los mayores problemas que existen en la actualidad, y con el que las personas tienen que vivir. Es la acidificación del agua, de los ríos, aguas subterráneas, principalmente por drenajes, relaves, disolución oxidativa, y lixiviación de sulfuros metálicos (Oviedo-Anchundia, Moina-Quimí, Naranjo-Morán, Barcos-Arias, 2017). Los sulfuros son minerales que están conformados por enlaces entre un elemento metálico como plomo, cobre, zinc, etc., con azufre. El molibdeno es un subproducto de los yacimientos. Entre los más encontrados están la piritita y la calcosina (Ministerio de Minería, 2019).

2.3. Efecto de la contaminación minera en la salud y en la biodiversidad en Ecuador

Los efectos de la contaminación por actividades mineras se ven reflejado en la salud de los ecuatorianos. Las poblaciones aledañas a estas actividades presentan trastornos y daños renales, afecciones al tracto respiratorio, depresión, alucinaciones, enfermedades neuronales y vasculares, efectos carcinógenos y manifestaciones cutáneas (Oviedo-Anchundia, Moina-Quimí, Naranjo-Morán, Barcos-Arias, 2017); de igual manera se ve reflejado sobre la biodiversidad del país. Los recursos que se ven más afectados son la flora y la fauna, en este último ovinos, bovinos, animales de tipo doméstico, aves y sobre todo en fauna acuática diferentes especies de peces (Galárraga-Sánchez, 2019). Se pierden también debido a esta actividad, que desencadena efectos como fragmentación del hábitat, su destrucción y contaminación del medio ambiente, especies de briofitas y grandes hectáreas de bosque, sobre todo de bosque nuboso. Siendo el bosque nublado un ecosistema de gran endemismo para los ecuatorianos, y fuente de servicios para su población (FAO, 2010). Esto ocurre porque la extracción de minerales da paso al cambio de las características físicoquímicas en los ecosistemas acuáticos produciendo, debido a la descarga de restos de la actividad, un medio ácido, los cuales no reciben un tratamiento de neutralización, contaminando también aguas subterráneas (PRAS, 2019).

2.4. Efectos del agua con metales pesados de la explotación minera sobre la biota

Los metales pesados son liberados a partir de actividades humanas como la industria, agricultura, pero sobre todo la minería, siendo una amenaza para el ser humano y ecosistemas en su totalidad. Además, hay una alta afectación a la biota acuática por los sedimentos, ya que estos actúan como un depósito de metales, y así aumentan la concentración de estos en el agua. Esta tiene relación con la materia orgánica presente y el tamaño de partícula. Son denominados metales traza. Llegan a alterar el equilibrio del medio en el que se encuentran (Castro, Valdés, 2012).

Depende de la especie que sea va a tener diferentes capacidades para poder captar el contaminante, muchas tienen resistencia a estos metales. Lo que ocurre en el caso, por ejemplo, de las plantas, es que las que son resistentes no permiten un mayor transporte de dicho elemento, también puede depender de la etapa de desarrollo en la que se encuentre (Ruiz Huerta y Armienta Hernández, 2012). Por otro lado, para el resto de las especies, y si se habla de fauna, la toxicidad es mucho más evidente, ya que presentan un crecimiento menor, los tejidos presentan necrosis, bajo porcentaje de supervivencia, mayor porcentaje de mortalidad, reducción de individuos (Ramos, Bastidas, García, 2012). Específicamente en la fauna acuática sobresale la disminución de distintas especies de peces y sus individuos, estudios muestran altas concentraciones encontradas en sus tejidos, por ejemplo, de plomo, específicamente en *Bryconamericus peruanus* o pez dorado, en *Brycon atrocaudatus* o pez sábalo, los cuales en muchas ocasiones son la base de la economía de poblaciones. Pérdida de animales de ganadería (vacas, cerdos, animales domésticos) por el uso de agua contaminada (Galárraga-Sánchez, 2019)

2.5. Estudios ecotoxicológicos de afectaciones por metales pesados

Existen muchas investigaciones y estudios ecotoxicológicos acerca de los

efectos que pueden provocar la presencia de metales pesados en un medio, sobre todo en agua y sedimento en diferentes especies de animales. Hay estudios acerca de la toxicidad aguda del cobre en larvas de camarón, en donde los efectos se vieron reflejados en la reducción de actividad locomotora, muerte de individuos, síntomas de estrés, adhesión a las paredes del contenedor que se utilizó para el experimento, los resultados demuestran que las concentraciones del metal dependen de la dureza del agua, que las concentraciones bajas al transcurrir 72 horas fueron más peligrosas y que crustáceos pueden acumular mayores niveles del metal pesado a baja salinidad. Entre las respuestas fisiológicas que causó la exposición al contaminante en concentraciones de 0,1 a 10 mg son consumo de oxígeno, actividad enzimática, por otro lado, en exposiciones menores a 0,1 mg produce un tipo de estrés proteico (Mendoza-Rodríguez, 2019). Hay estudios con macroinvertebrados acuáticos, específicamente con larvas de insecto de orden díptera con el fin de evaluar mercurio, plomo y cadmio, y ellos según su estado larvario. Los resultados dictan que van a ser más o menos susceptibles a presentar efectos negativos según la edad que presenten y el tiempo que fueron expuestas. Las larvas más jóvenes son más sensibles a la toxicidad que las adultas (Iannacone Oliver, Salazar Capcha, Alvariño Flores, 2003). Además, se han realizado investigaciones acerca de los efectos del arsénico sobre este tipo de organismos (macroinvertebrados) en donde los resultados indican que los afecta principalmente por su característica de insectos poco desarrollados afectando directamente el equilibrio del ecosistema en general y sobre todo a la cadena trófica (Morales Cabrera et al., 2017).

Incluso estos ensayos han sido practicados con microorganismos, como la exposición de plomo y cadmio a cianobacterias resultando en su alta capacidad para bioacumular metales pesados, se detecta, por pequeñas concentraciones de plomo, crecimiento y al mismo tiempo su inhibición, pero no tolera largos tiempos de exposición. Esto se logra detectar después de 6 días (Arunakumara, Xuecheng, Song, 2007).

2.5.1. Ecotoxicología y Características de organismos para estudios

ecotoxicológicos

La ecotoxicología es la encargada de evaluar los diferentes efectos adversos de los contaminantes sobre la flora y fauna (biota) con el empleo de animales en ensayos a nivel de laboratorio con su debida aclimatación, es decir, se toman en cuenta características del hábitat de las especies con las que se trabaja. Es una herramienta, ya sea para evaluar los posibles riesgos ambientales, o para determinar la sensibilidad de los organismos expuestos a un contaminante (Silva, Rocha, Freitas, Pereira, y Carvalho Neta, 2015).

Para realizar estudios ecotoxicológicos es necesario el empleo de organismos que estén estandarizados, que tengan ciertas características como practicidad, que sean sencillos, repetibles y sobre todo que sean sensibles a los cambios en general (Iannacone Oliver, Salazar Capcha, Alvariño Flores, 2016). Además, que tengan bajos costos de mantenimiento, que requieran poca aireación y pocos elementos extra (Iannacone y Alvariño, 2005). Es importante que sean de población abundante y que tengan una alta distribución (Silva, Fuentealba, Bay-Schmith y Larrain, 2007).

2.6. Mediciones en estudios ecotoxicológicos

2.6.1. Mediciones letales y subletales

Los estudios ecotoxicológicos permiten detectar diferentes efectos sobre los organismos con los que se trabaja y los cuales se encuentran expuestos a concentraciones de elementos de baja o elevada toxicidad, en general a agentes físicos o químicos, en condiciones controladas experimentales (Sobrero, 2010). Los efectos ocurren dependiendo de la tolerancia del organismo, y del tipo de exposición según el tiempo y la frecuencia. Existen, por lo tanto, efectos letales, como es la muerte (DL50) o supervivencia del individuo; y efectos subletales, en donde distintos tipos de respuesta ocurren en niveles biológicos de organización,

variaciones fisiológicas como la movilidad, variación del comportamiento, aislamiento y morfológicas, incremento o disminución del crecimiento, peso, variaciones poblacionales, alteraciones celulares y bioquímicas (Giusto, 2014).

2.6.2. Biomarcadores

Los biomarcadores son pruebas que se realizan para identificar variaciones celulares, genéticas, bioquímicas y fisiológicas a nivel del tejido o del organismo entero, demostrando la exposición a diferentes componentes químicos. Estas variaciones son cuantificables en los organismos que se encuentren en un medio de compuestos tóxicos (Gamboa, Reyes y Arrivillaga, 2008).

Es una respuesta bioquímica o fisiológica a nivel de interacciones moleculares y a nivel celular de un organismo frente a un peligro ya sea de tipo físico químico o biológico. El hecho de que existan elementos y compuestos introducidos por actividades humanas en medios acuáticos hace que los organismos generen una serie de reacciones conducidas por las circunstancias en las que están, por ejemplo, la concentración del contaminante, su distribución, la presencia de tóxicos adicionales, exposición (tiempo). Pueden detectar efectos en tiempos relativamente cortos de exposición y a concentraciones bajas, captan muy bien en general los factores que causan cualquier tipo de estrés, esto quiere decir que son sensibles a los tenses. Existen biomarcadores moleculares y genéticos, fisiológicos e histopatológicos (Toro-Restrepo, 2011).

Los biomarcadores son utilizados en estudios en donde el principal objetivo es la evaluación de los procesos y estrés oxidativo que ocurre dentro de la célula. Este tipo de estrés ha sido calificado como un mecanismo de toxicidad y ocurre cuando se presenta una carga muy elevada de radicales libres (Soto, 2014).

Existen numerosas investigaciones de biomarcadores sobre animales y plantas. De este último se realizó un estudio de biomarcadores de contaminación por

cadmio. Utilizaron a las plantas como un bioindicador de la calidad del medio afectado por actividad antrópica, ya que ellas también generan una respuesta al estar expuestas a contaminación, en este caso por un metal pesado (Pernía, De Sousa, Reyes, Castrillo, 2008). Son utilizados también en estudios con animales de ganadería. Ya que los bovinos presentan cierto estrés agudo durante el presacrificio, y usan biomarcadores con el objetivo de verificar el bienestar del animal al evaluar este síntoma de estrés que es experimentado. Esta puede aumentar al restringir el espacio de hábitat, de su movimiento, transporte (Romero Peñuela, Uribe-Velásquez, Sánchez Valencia, 2011). También existen estudios realizados en macroinvertebrados bentónicos. Los cuales son expuestos principalmente a metales pesados, en este caso se utilizó cadmio, con el fin de evaluar las respuestas de los organismos, e interpretar cómo el contaminante está afectando de forma negativa al ecosistema (Gamboa, Reyes y Arrivillaga, 2008).

Existen enzimas utilizadas para la eliminación catalítica del peróxido de hidrógeno como la catalasa, la tioredoxina peroxidasa y el glutatión peroxidasa. Pero de este grupo la catalasa es la más eficaz para eliminar peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es un mensajero que toma parte en la señalización, la cual ocurre dentro de la célula, que está regulada por el estrés oxidativo, una reducción del peróxido de hidrógeno por sobreexposición de catalasa se refleja en un menor estrés oxidativo (Martínez Arias, L et al., 2017). La catalasa y el glutatión son fuentes antioxidantes principales que reaccionan con el fin de brindar protección a la célula de, principalmente, el estrés oxidativo que es generado por elementos tóxicos existentes en el medio. Son los más grandes sistemas de defensa contra los xenobióticos. Otra de las formas para realizar la evaluación de este daño oxidativo es con la pérdida de grupo sulfhídrico o grupo -SH, ya que se ven consumidas por los procesos de oxidación (Soto, 2014).

2.7. Macroinvertebrados

Los macroinvertebrados acuáticos son organismos que viven en ríos, específicamente en la vegetación acuática, en rocas, troncos. Son característicos por su longitud de 0,5 mm a 5 mm. Son fácilmente detectables. Su presencia o ausencia determina la calidad del medio acuático en el que se encuentran, por lo que son muy utilizados como bioindicadores alrededor del mundo. Los más comúnmente empleados son de orden Plecoptera, Ephemeroptera, Trichoptera. Ya que no sólo se conoce muy bien su ecología, sino también su taxonomía, y su desempeño como buenos bioindicadores de calidad (Roldán-Pérez, 2016).

2.7.1. *Nectopsyche* (Leptoceridae)

Pertencen al orden Trichoptera, de organismos que dependen de un medio acuático para sobrevivir, se caracterizan porque sus alas están recubiertas por pelos, con algunas excepciones, tienen antenas largas, son de color oscuro y algunas poseen colores más claros, la longitud de los adultos oscila entre 2 mm a 30 mm, tienen una gran habilidad para construir con diferentes materiales y es uno de los órdenes más diversos que hay. Pertencen a la familia Leptoceridae, cuyo tipo de alimentación se basa en la ingesta de materia orgánica en descomposición, construyen sus casas de tipo portátil, la cabeza de las larvas presenta manchas de diferente color, tienen antenas grandes lo que no es muy común en esta familia, las patas de la segunda y tercera fila tienden a ser más peludas y largas. Viven en hábitats lóticos y lénticos (Springer, 2010).

El género considerado más común es *Nectopsyche*, tiene los estadios de huevo, larva que dura varias semanas, pupa que puede durar aproximadamente dos semanas y adulto que es de vida corta. Las larvas construyen sus casas de distintos materiales y seda en formas tubulares, inclinadas, largas y estrechas, su población se encuentra altamente distribuida. Tiene una gran variedad de especies, las cuales pueden ser clasificadas por la forma en que se alimentan ya que existen recolectores de depósito y cortadores (Huamantínco y Ortiz, 2010). Se alimentan de raspado de algas, fragmentación de madera y hojas líquidos azucarados y agua (Zamora-Muñoz, Sáinz-Bariáin y Bonada, 2015). En

el Ecuador se encuentra distribuido desde los 2000 m.s.n.m hasta los 3800 m.s.n.m. a lo largo de Los Andes (Acosta, Ríos, Rieradevall y Prat, 2009).

Son considerados buenos bioindicadores porque cumplen con los principales enfoques, los que ocurren a nivel de ecosistemas, comunidades, poblaciones y los que ocurren a nivel de cambios en el comportamiento, reducción en la tasa de crecimiento, cambios en su alimentación, reproducción, alteraciones fisiológicas y bioquímicas, metabolismo celular y actividad enzimática, proporcionando información acerca del medio en el que se encuentran y los riesgos ambientales que se pueden presentar por contaminación (Arias et al., 2007)

3. METODOLOGÍA

3.1. Muestreo

3.1.1. Agua y sedimento

Con el fin de conocer los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones reales de metales pesados que existen en los cuerpos hídricos se realizó el muestreo de tres ríos para determinar la afección causada por las actividades mineras durante la época de invierno. Se tomaron las dos primeras muestras en la parroquia de Pacto al noroccidente de la provincia de Pichincha, en la zona de influencia de minería y una tercera muestra en los ríos de descarga de una minera en la ciudad de Machala en la provincia de El Oro. Se midieron parámetros fisicoquímicos in situ como: temperatura, oxígeno disuelto, conductividad con una sonda multiparámetro. En cada punto se tomó una muestra de sedimento y una muestra de agua de 1 litro de forma manual para posteriores pruebas en laboratorio, estas fueron almacenadas en botellas ámbar que previamente se lavaron con ácido nítrico, además se las transportó con bloques de hielo (*ice packs*) y fueron almacenadas a 4°C.

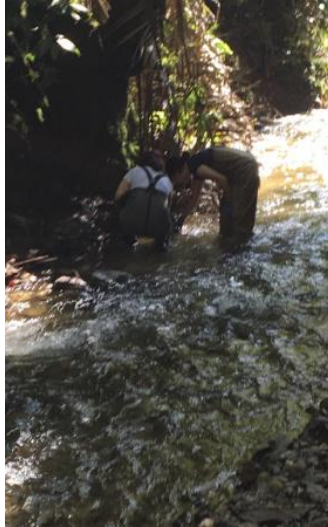


Figura 1. Toma de muestras de agua y sedimento en un río de influencia minera.

3.2. Análisis de laboratorio

3.2.1. Determinación de metales pesados en agua y suelo

Para realizar los análisis de metales pesados en las muestras de agua y suelo se utilizó el método de ICP-MS el cual usa espectrometría de masas con un análisis multielemental simultáneo para detectar todos los metales pesados presentes.

3.3. Pruebas de pH

Para determinar la influencia de los metales pesados sobre el pH se realizaron pruebas utilizando arsénico en tres diferentes concentraciones. Se emplearon 16 contenedores de vidrio (4 repeticiones por concentración), las cuales se lavaron con jabón neutro y ácido nítrico. De igual manera se colocó 1.5 litros de agua potable la cual fue reposada por 4 horas, pero ahora con diferentes concentraciones de arsénico. Se utilizaron concentraciones de 0,05 ppm, 0,1 ppm, y 0,5 ppm. Se midió pH durante 5 días consecutivos. Finalmente, se digestó

una muestra de 45 ml de agua con la concentración del metal y con 5 ml de ácido nítrico. Se preparó un blanco con 5 ml de ácido nítrico, todo fue colocado en tubos de teflón. Los tubos se colocaron en un digestor por 30 minutos. Se filtró el contenido de los tubos en balones de 50 ml y se analizaron por medio de ICP. Finalmente se determinó a qué concentración hay más interacción del pH.

3.4. Experimentación

3.4.1. Recolección de individuos de *Nectopsyche*

La recolección de los individuos de *Nectopsyche* se la realizó en el Río Alambi, con ayuda de una red en D, se utilizó la técnica de patada, se recogieron alrededor de 300 individuos. Posteriormente los individuos fueron llevados en agua de río y almacenados en condiciones de temperatura de 18°C para su aclimatación.



Figura 2. Recolección de individuos del género *Nectopsyche*.



Figura 3. Peceras de aclimatación para los individuos del género *Nectopsyche*.

3.4.2. Simulación del medio

3.4.2.1. Microcosmos

Los microcosmos se construyeron en peceras de vidrio de 23 cm x 8 cm, aireadores con niveles de regulación de aire (bajo, medio y alto). Antes de la implementación del microcosmo las mismas fueron lavadas con jabón neutro y una mezcla de 50 ml de agua destilada y 50 ml de ácido nítrico. Se añadió 1.5 litros de agua potable que pasó por un proceso de decoloración previo. Durante la experimentación se mantuvieron en un cuarto a una temperatura de 18 °C (Iannacone, Salazar, Alvariño, 2003). Además, tuvieron luz por 12 horas y oscuridad por 12 horas.



Figura 4. Microcosmos montados para la experimentación.

3.4.2.2. Alimento

Para la alimentación de las larvas de *Nectopsyche* se utilizó algas del perifiton de río. Se recolectaron rocas del Río Alambi, se realizó un raspado de estas, posteriormente todo el material obtenido de las rocas fue colocado en una bandeja de plástico que contenía baldosas que fueron colonizadas y aire continuo, durante una semana.



Figura 5. Recolección de rocas para preparar el alimento.

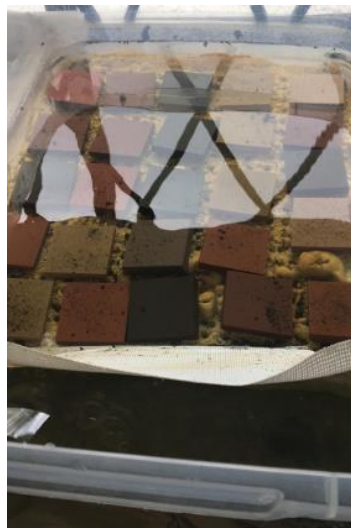


Figura 6. Colonización de baldosas.

3.4.3. Cambios subletales en macroinvertebrados acuáticos *Nectopsyche* (Leptoceridae)

Para la experimentación en los microcosmos se adicionaron diferentes concentraciones del metal pesado, arsénico. Las concentraciones que se usaron fueron 0.05 ppm C1 (baja), 0.1 ppm C2 (media), 0.5 ppm C3 (alta), y un control con agua potable. Para cada una se realizaron 4 réplicas con el fin de minimizar la variabilidad de los datos. Se emplearon 20 individuos por cada unidad experimental. El tiempo de experimentación fue de 5 días.

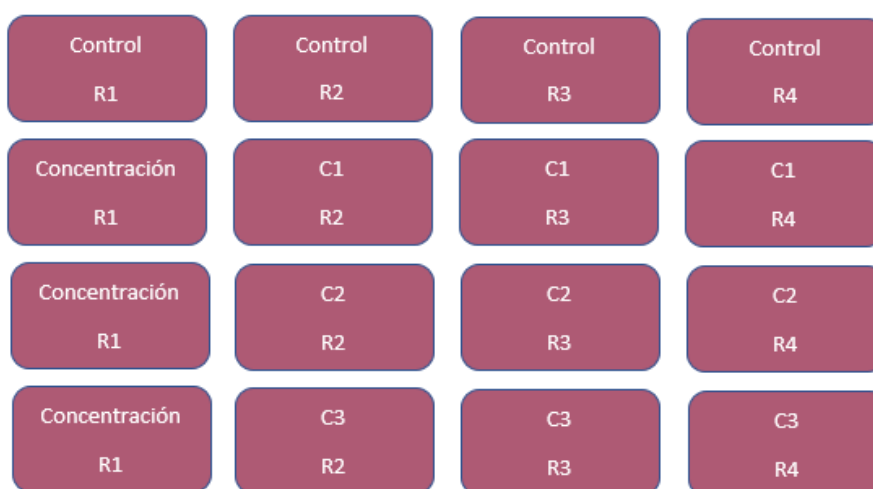


Figura 7. Esquema del diseño experimental.

a) R= Repetición; C= Concentración

3.4.3.1. Medición de parámetros fisicoquímicos

El registro de los parámetros fisicoquímicos se realizó durante los 5 días de la experimentación. A la hora 0, 24 h, 48h, 72h y a las 96 h. Se midió el pH con un potenciómetro modelo YSI Pro1030, y temperatura, oxígeno disuelto y conductividad con ayuda del equipo medidor multiparámetro YSI ProODO Sistema Multisonda.

3.4.3.2. Medición de parámetros biológicos

Primero se llevó el registro del número de individuos que sobrevivían cada 24 horas. Cada día se realizaba el conteo del número de individuos vivos y muertos, posteriormente para el procesamiento de datos se utilizaron tablas de supervivencia, determinando el promedio de vida lx como individuos sobrevivientes en un tiempo determinado (Juárez y Villagra de Gamundi, 2011), y determinando el índice de mortalidad qx como muertes que se producen en un tiempo (POSTGRAU, 2011). Además, se evaluó la movilidad, la movilidad alta se reflejaba en un rango de 9 a 12 ciclos de brazadas, una movilidad media de 4 a 8 y una movilidad baja de 1 a 4 en un tiempo de 10 segundos, para esto se tomó una muestra de 5 individuos de la muestra total, se determinó a partir del número de brazadas que daban los individuos antes de ser expuestos a las diferentes concentraciones de arsénico.

3.5. Análisis de metales pesados

Se extrajo de cada ensayo (microcosmos) 60 ml de agua. Se colocaron en balones de 100 ml, una vez filtrados y se analizaron por ICP usando el método US EPA 3015A. Esto se lo realizó una vez al inicio y una vez al final de la experimentación.

3.6. Análisis de respuesta bioquímica a los contaminantes

Los organismos que siguieron vivos después de los 5 días de experimentación fueron congelados en nitrógeno líquido, después triturados con un pistilo y almacenados en frío a -80°C en tubos cerrados. Se utilizaron los protocolos de laboratorio de la Universidad de Las Américas, se trabajó con el Protocolo Catalasa, Protocolo Glutathion y el Protocolo grupo -SH.



Figura 8. Individuos del género *Nectopsyche* almacenados a -80°C .

3.6.1. Biomarcadores

Catalasa

Se pesaron 0.7 gr de NaH_2PO_4 como solución A y 0.7 gr de Na_2HPO_4 como solución B y fueron disueltas cada una en 100 ml de agua destilada. Se preparó una solución tampón tomando 39 ml de la solución A y 61 ml de la solución B, se aforó a 200 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7. Se preparó una solución de H_2O_2 30% con 600 ul de H_2O_2 al 30 % y se aforó a 100 ml de la solución tampón. Primero se preparó el blanco con 1.5 ml de solución tampón y se trabajó a 240 nm de longitud de onda y se encendió el espectrofotómetro. Además, se preparó una solución de PBS y un inhibidor de proteasa. Para el PBS se usó 4 gr de NaCl , 0.1 gr de KCl , 0.71 gr de Na_2HPO_4 , 0.135 gr de KH_2PO_4 , se aforó a 500 ml de agua destilada. Para el inhibidor se utilizó 7.3 mg de EDTA y 7.3 mg de fluoruro de sodio. El inhibidor fue aforado en 10 ml de PBS, de esta solución se tomaron 100 ul y se colocaron en un frasco con el contenido de *Nectopsyche*, se realizó una homogeneización y se centrifugó a 4°C por 5 minutos a 1500 rpm para conseguir la separación del medio sólido del líquido. Para elaborar la muestra se colocaron 990 ul de solución tampón, 500 ul de solución H_2O_2 30% y 10 ul del sobrenadante de los animales triturados en una cubeta de cuarzo. Se

colocó en el espectrofotómetro y se midió la absorbancia a los 10 segundos y a los 70 segundos, se llevaron a cabo dos repeticiones. Para obtener la actividad de la enzima Catalasa se utiliza la siguiente fórmula:

$$(\text{Abs } 10'' - \text{Abs } 70'') / 0.01$$

(Li y Schellhorn, 2007).

Glutation

Se pesaron 278 mg de NaH_2PO_4 y se diluyó en 10 ml de agua destilada como solución 1, y se pesaron 2,84 gr de NaH_2PO_4 en 100 ml de agua destilada. Para realizar la solución tampón se colocó en una probeta 5,3 ml de la solución y 94,7 ml de la solución 2, se procedió a añadir 100 ml de agua destilada y se llevó a un pH 8. Después se pesó 19.8 mg de DTNB y se disolvió en 5 ml de acetona. Se preparó un blanco con 1475 μl de PBS y 25 μl de DTNB más acetona, se trabajó a 412 nm de longitud de onda y se encendió el espectrofotómetro. Para realizar la muestra se colocaron 1450 μl de solución tampón, 25 μl de DTNB y 25 μl del sobrenadante. Se procedió a medir en el espectrofotómetro, se realizaron 2 repeticiones (Akerboom y Sies, 1981).

Grupo -SH

Para realizar la solución buffer se pesaron 3.54 gr de Na_2HPO_4 y se disolvió en 250 ml de agua destilada, se pesaron 9,3 mg de EDTA y se disolvió en la solución anterior, después se procedió a llevar el pH a 8. Se preparó una solución de SDS 10%, para esto se pesó 1 gr de SDS y se disolvió en 10 ml de agua destilada. Se preparó también una solución de DTNB 100 mM, para ello se pesaron 19.8 mg de DTNB y se disolvieron en 5ml de acetona. En un tubo de ensayo se colocaron 0.3 ml de SDS 20% y 2.8 ml del buffer, se hizo vórtex y se incubó por 20 min a 37° C. Después de colocó 0.1 ml de DTNB y se incubó por otros 15 minutos a la misma temperatura. En placas de 96 pocillos se colocaron 200 μl de la solución anterior, se realizaron dos repeticiones, y se colocó en el lector de

placas (Habeeb, 1972).

3.7. Análisis de datos

Primero se realizaron las pruebas de normalidad Shapiro-Wilk (menos de 50 datos), y Kolmogorov-Smirnov (más de 50 datos) y su corrección con Lilliefors. Los datos que no mostraban una distribución normal fueron transformados con . Para el grupo de datos que mostraban significancia fue posible realizar las pruebas ANOVA, por otro lado, para el grupo de datos que no eran significantes, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. De esta manera se detectaron si existían o no diferencias estadísticamente significativas. Para comparar las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey, y la prueba de Levene se utilizó para determinar la igualdad entre varianzas. Para esto se utilizó el programa estadístico Statistica software versión 10.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Parámetros fisicoquímicos

4.1.1.1. Temperatura

La temperatura no mostró cambios estadísticamente significativos entre tratamientos durante la experimentación ($F=1,3$; $p=0,297307$). Sin embargo, para el tiempo de experimentación sí hay diferencias estadísticamente significativas ($F=3,3$; $p=0,026182$) ya que la temperatura cambia a partir del segundo día.

Según los datos más homogéneos se forman dos grupos, el grupo A está contenido por el blanco, concentración 2 y concentración 3. Y por otro lado el grupo B agrupando el blanco, concentración 1 y concentración 3.

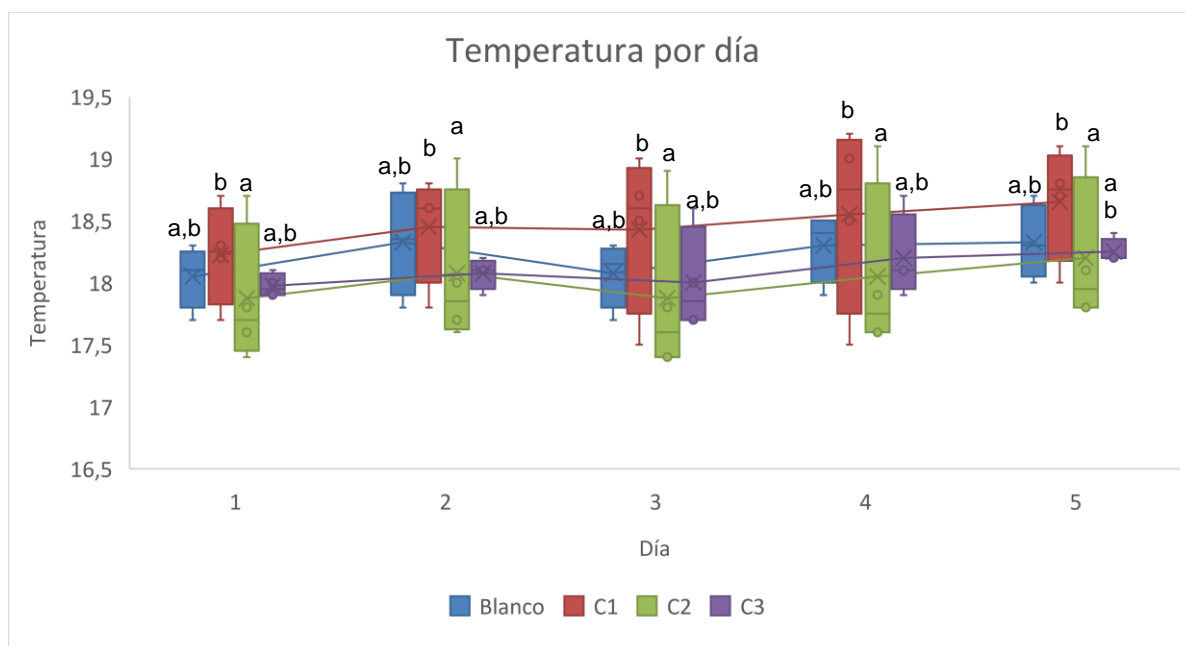


Figura 9. Temperatura registrada durante el tiempo de experimentación.

Tabla 3.
Análisis de varianza ANOVA.

TEMPERATURA					
Effect	SS	DOF	MS	F	p
DIA	0,0013	3	0,0004	3,3	0,026182
CONCENTRACION	0,0006	4	0,0002	1,3	0,297307
CONCENTRACION*DIA	0,0001	12	0,0000	0,0	0,999999
ERROR	0,0077	60	0,0001		

4.1.1.2. Conductividad

La conductividad mostró cambios estadísticamente significativos durante la experimentación (Día: $F=227,43$; $p=0,0000$) (Concentración: $F=58,02$; $p=0,0000$). La tendencia que tiene la conductividad a medida que avanza el tiempo de la experimentación es de incrementarse en todas las concentraciones. Existen datos que son homogéneos por lo que se agruparon en tres, en el primer

grupo A se encuentra el blanco y la concentración 1, en el segundo grupo B está la concentración 2 y en el tercer grupo C se encuentra la concentración 3. En el caso de días existen cinco diferentes grupos, por el incremento tan pronunciado de conductividad cada 24 horas.

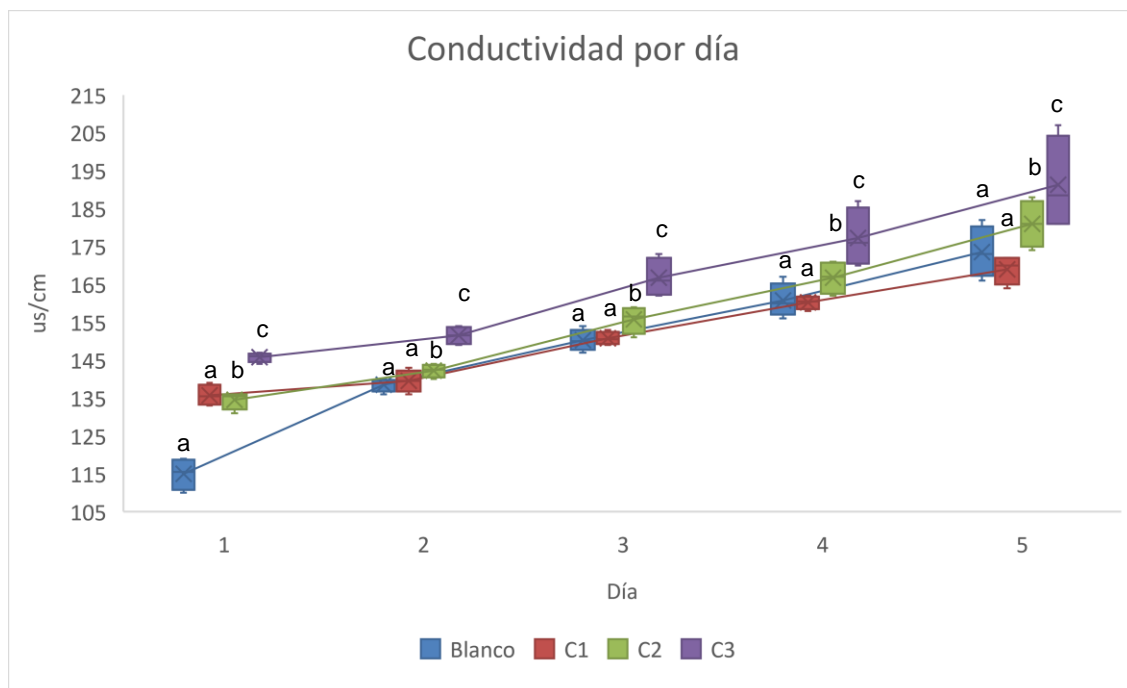


Figura 10. Conductividad registrada durante el tiempo de experimentación para cada tratamiento.

Tabla 4.

Análisis de varianza ANOVA.

CONDUCTIVIDAD					
Effect	SS	DOF	MS	F	p
DIA	21257	4	5314	227,43	0,000000
CONCENTRACION	4067	3	1356	58,02	0,000000
CONCENTRACION*DIA	929	12	77	3,31	0,001006
ERROR	1402	60	23		

4.1.1.3. Oxígeno disuelto

No existieron cambios estadísticamente significativos de oxígeno disuelto entre los tratamientos ($F=2,5$; $p=0,064983$). Ocurre lo contrario con el oxígeno disuelto en los días de experimentación que sí presentan diferencias significativas

($F=15,2$; $p=0,000000$). Debido a la homogeneidad de los datos se forman dos grupos, el primer grupo A de los días 3, 4 y 5, y el segundo grupo B de los días 1 y 2.

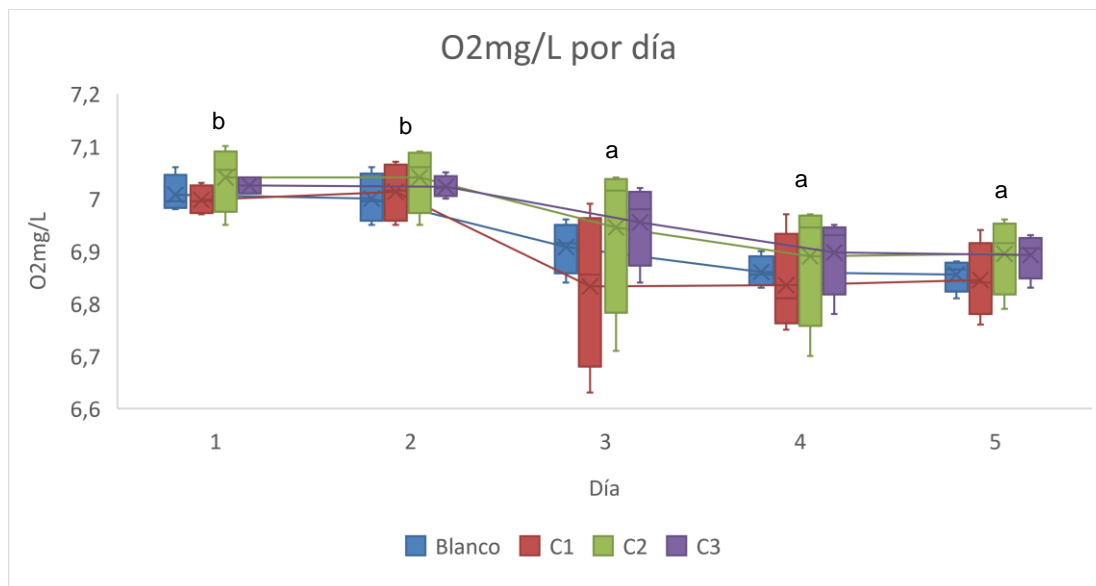


Figura 11. Oxígeno disuelto registrado durante el tiempo de experimentación para cada tratamiento.

Tabla 5.

Análisis de varianza ANOVA.

Effect	O2 mg/L				
	SS	DOF	MS	F	p
DIA	0,361	4	0,090	15,2	0,000000
CONCENTRACION	0,045	3	0,015	2,5	0,064983
CONCENTRACION*DIA	0,017	12	0,001	0,2	0,995035
ERROR	0,357	60	0,006		

4.1.1.4. Pruebas de Arsénico

Las concentraciones de arsénico a lo largo del experimento se mantuvieron casi constantes con variaciones mínimas. Las diferentes concentraciones de arsénico muestran diferencias no significativas ($F=1,636955$; $p=0,233013$). Formándose para ambos casos cuatro diferentes grupos A B, C, D uno por cada concentración.

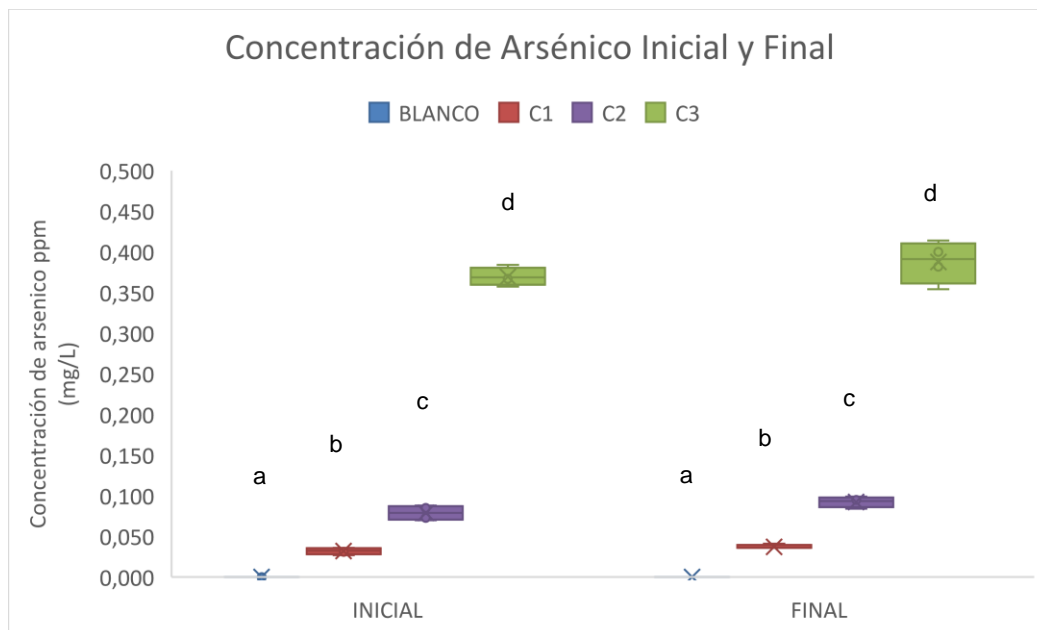


Figura 12. Análisis de la concentración de arsénico en los tratamientos.

Tabla 6.

Análisis de varianza ANOVA.

CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO INICIAL - FINAL						
	SS	DOF	MS	F	p	
CONCENTRACION	0,000143	3	0,000048	1,636955	0,233013	
ERROR	0,000348	12	0,000029			

Los valores de pH muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F=49,3$; $p=0,000000$), de igual forma hay variaciones estadísticamente significativas para los días de ensayo ($F=17,7$; $p=0,000000$), estos cambios se mantienen a lo largo de la experimentación. Se forman por lo tanto y según la homogeneidad entre sí, dos grupos. El primer grupo A contiene a las concentraciones 1, 2 y el blanco; y el segundo grupo B contiene a la concentración más alta, concentración 3.

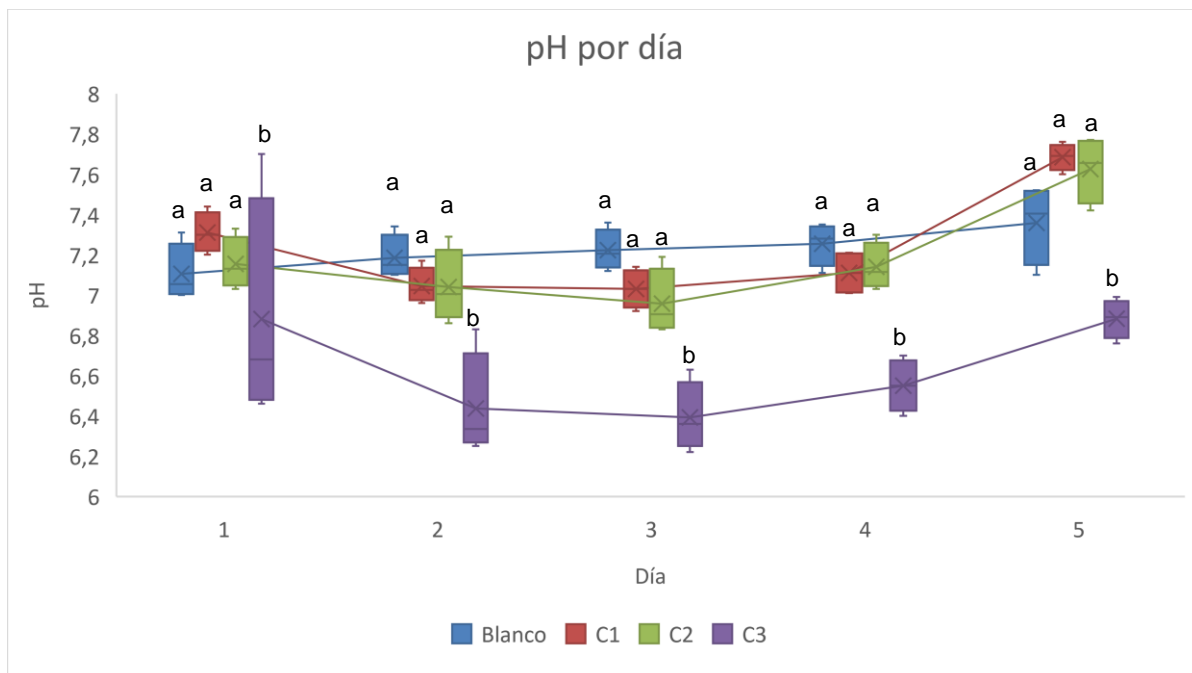


Figura 13. pH registrado durante el tiempo de experimentación para cada tratamiento.

Tabla 7.

Análisis de varianza ANOVA de pH.

Effect	pH				
	SS	DOF	MS	F	p
DIA	2,479	4	0,620	17,7	0,000000
CONCENTRACION	5,187	3	1,729	49,3	0,000000
CONCENTRACION*DIA	0,848	12	0,071	2,0	0,038407
ERROR	2,105	60	0,035		

4.1.2. Mortalidad

El índice de mortalidad de la población del género *Nectopsyche* se muestra mayor para las concentraciones más altas de arsénico. El número más alto de muertes registradas ocurre en las concentraciones media y alta, es decir, en la concentración 2 de 0,1 mg/L y en la concentración 3 de 0,5 mg/L. Por lo tanto, el promedio de vida se muestra más favorable en la concentración más baja (C1) de 0,05 mg/L y en el control.

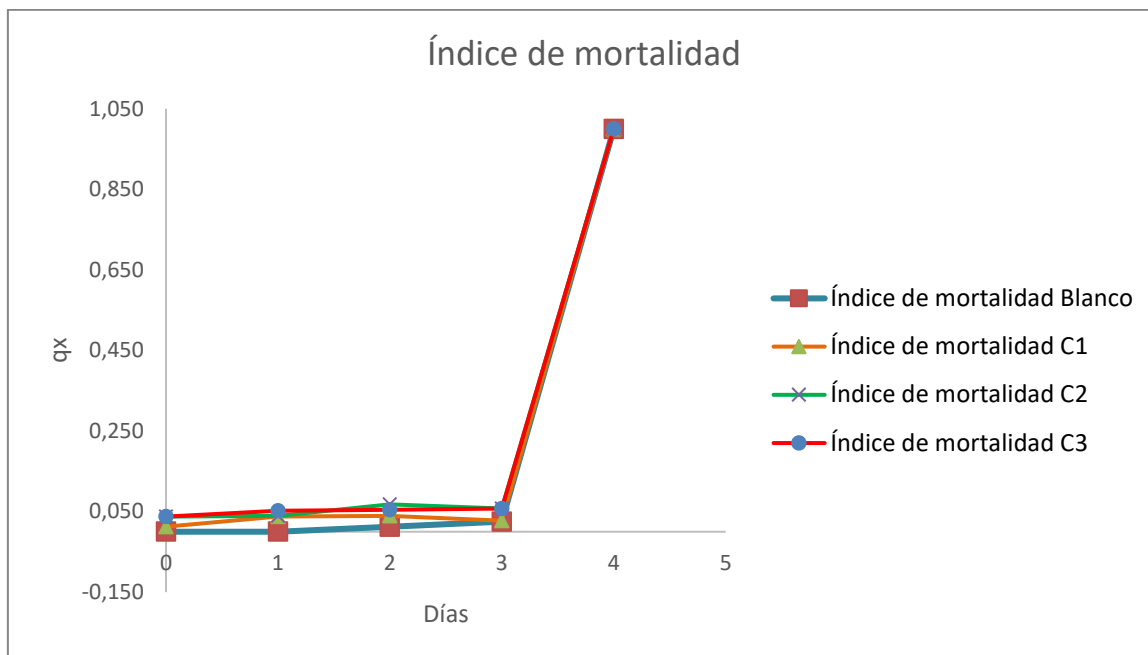


Figura 14. Índice de mortalidad de los individuos del género *Nectopsyche* registrado en cada tratamiento.

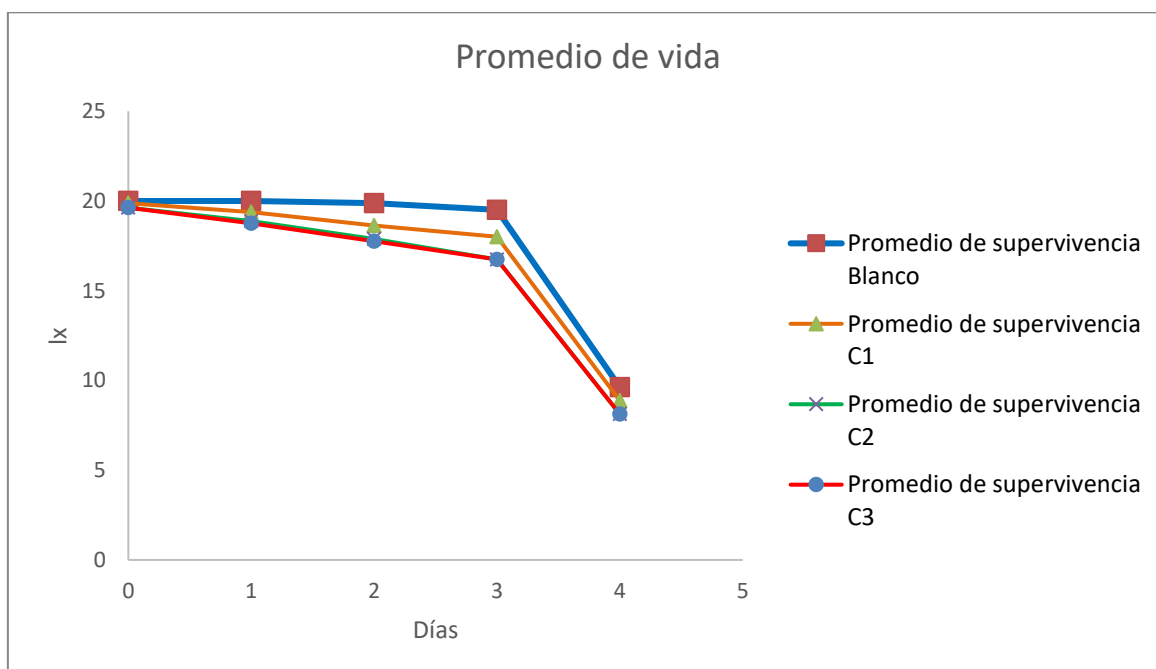


Figura 15. Promedio de vida de los individuos del género *Nectopsyche* registrado en cada tratamiento.

4.1.3. Movilidad

Al evaluar la movilidad de los individuos se obtuvo que a medida que la

concentración aumenta existe menor movilidad. Existió el menor nivel de movilidad en la concentración 3, movilidad media-baja en la concentración 2, y una movilidad media en la concentración 1. En el blanco la movilidad se mantuvo alta durante todo el tiempo de experimentación.

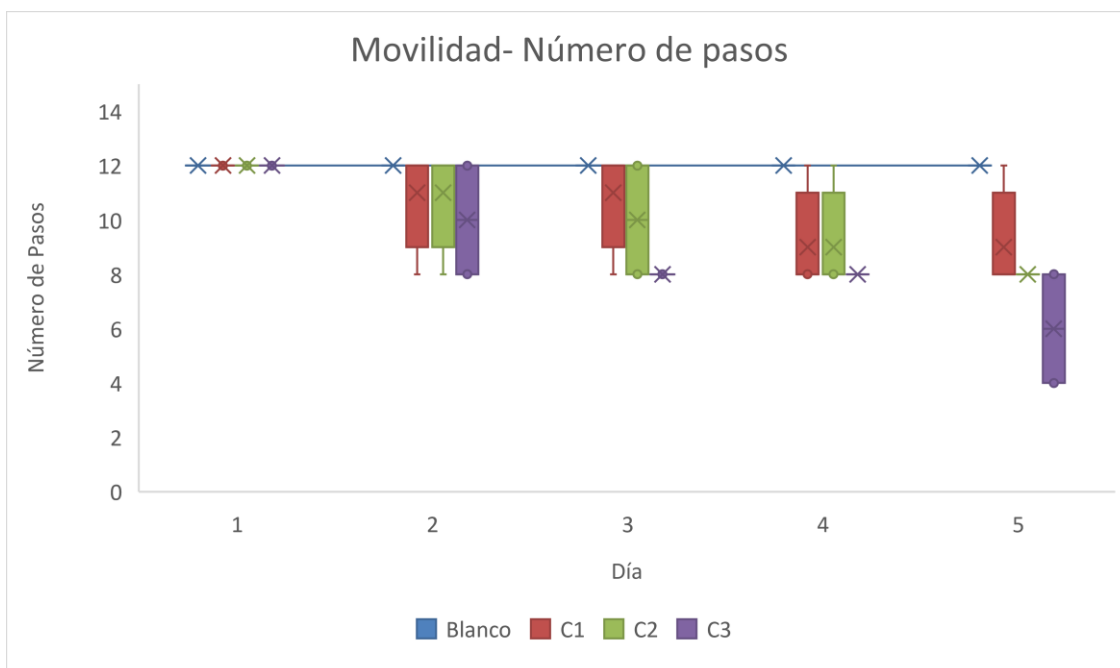


Figura 16. Movilidad cuantificada por día.

4.1.4. Biomarcadores

4.1.4.1. Catalasa

La actividad de la catalasa disminuye a medida que las concentraciones de arsénico aumentan. En la prueba de catalasa, los resultados se muestran significativos con respecto a las diferentes concentraciones ($F=44,703$; $p=0,000001$). Para esta prueba se pueden ver identificados tres grupos. El primer grupo A contiene la concentración 2 y 3, el segundo grupo B contiene a la concentración 1 y el tercer grupo C corresponde al blanco.

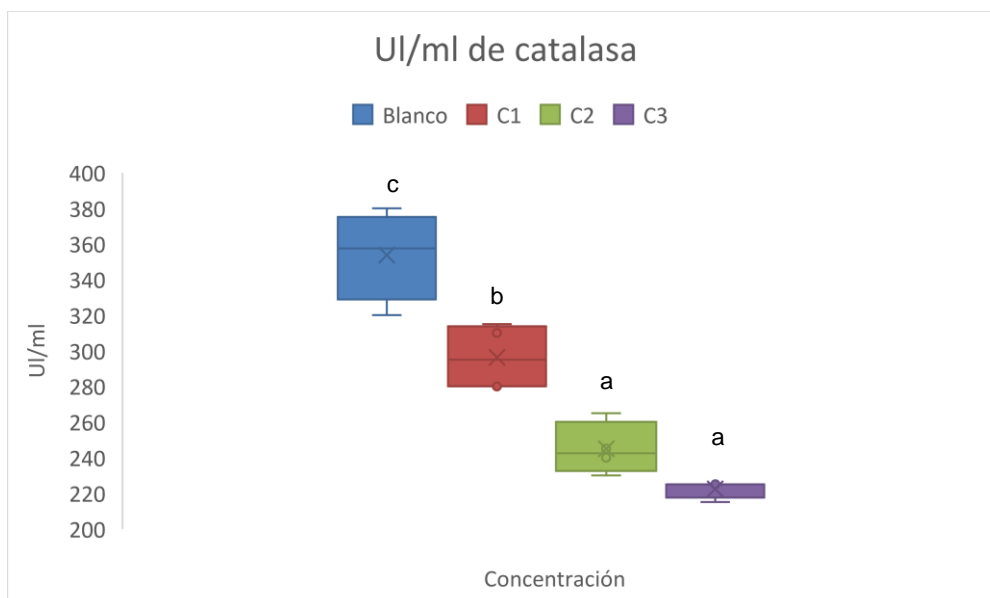


Figura 17. UI/ml de catalasa por concentración.

Tabla 8.

Análisis de varianza ANOVA de catalasa.

	CATALASA				
	SS	DOF	MS	F	p
CONCENTRACION	40931	3	13644	44,703	0,000001
ERROR	3663	12	305		

4.1.4.2. Glutation

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el glutatión y las concentraciones ($F=16,358$; $p=0,000002$). En esta prueba se pueden apreciar tres grupos. El primer grupo, A, contiene a la concentración 1 y 2, el segundo grupo B contiene a la concentración 3 y por último el tercer grupo C contiene al blanco. La gráfica demuestra que a medida que la concentración del metal aumenta la cantidad de glutatión disminuye.

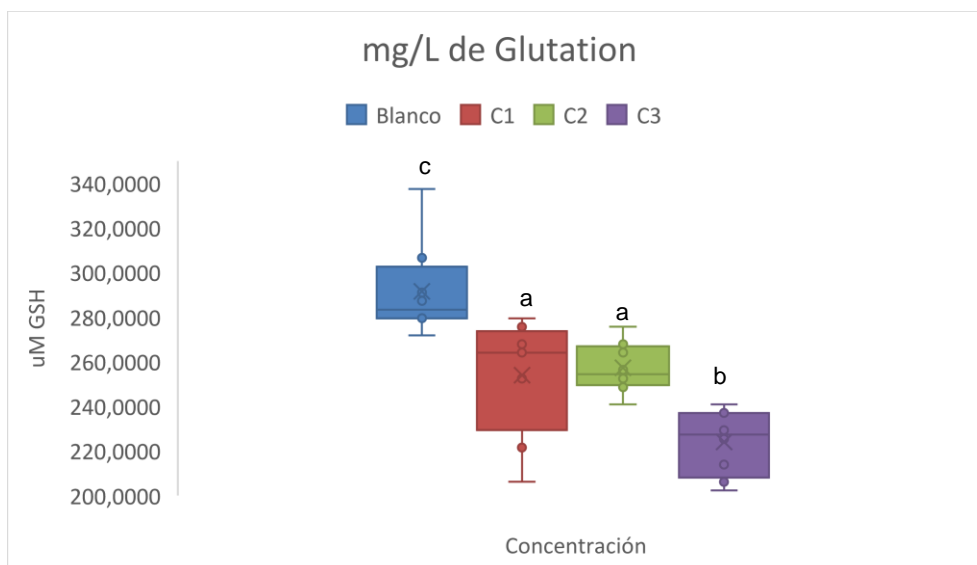


Figura 18. mg/L de glutatión por concentración.

Tabla 9.
Análisis de varianza ANOVA.

GLUTATION					
	SS	DOF	MS	F	p
CONCENTRACION	18343	3	6114	16,358	0,000002
ERROR	10466	28	374		

4.1.4.3. Grupo -sh

En la prueba de grupo -SH, los resultados se muestran estadísticamente significativos con respecto a las diferentes concentraciones empleadas, el valor de p es de 0,0000. La disminución de grupo -SH ocurre en función del incremento de la concentración de arsénico.

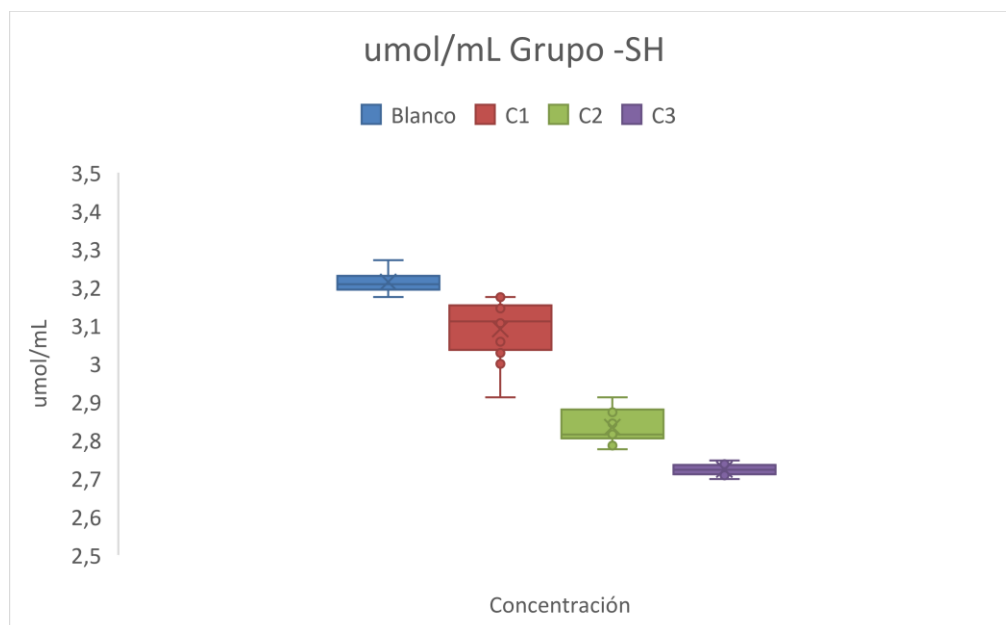


Figura 19. umol/mL de grupo -SH por concentración.

4.2. Discusión

En general los resultados que se obtuvieron a partir del presente estudio respaldan en su totalidad las diferentes hipótesis planteadas en cuanto a la variabilidad del pH según las concentraciones utilizadas de arsénico y los efectos subletales sobre los individuos del género *Nectopsyche*.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, la temperatura del experimento se inició con 18° C, temperatura que permite mantener el medio en condiciones similares a las del hábitat de los organismos (Iannacone, Salazar, Alvariño, 2003). Ésta presentó un aumento en todos los tratamientos a medida que avanzaba el tiempo de experimentación, lo que pudo ser causado principalmente por alteraciones dentro del lugar donde se realizaban los ensayos. No obstante, para reducir este efecto de la incidencia del acceso o corriente fría de viento generado por el climatizador, los microcosmos fueron ubicados al azar (sin agruparlos por concentración).

La conductividad presentó de igual manera un aumento en los resultados obtenidos. Lo que se esperaba debido al incremento de la temperatura (Solís-Castro, Zúñiga-Zúñiga, y Mora-Alvarado, 2018). Además, este comportamiento

se ve sustentado por la evaporación del agua en las peceras, lo que resultó en una mayor lectura de los iones presentes. En este tipo de soluciones el comportamiento presentado por la conductividad es directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos en el medio (Combatt, Narváez, y Bustamante, 2015).

El oxígeno disuelto presentó una tendencia a disminuir en todas las concentraciones durante el transcurso de los cinco días de experimentación, esto ocurre por la relación inversa que se da con la temperatura del medio, y también debido al consumo de oxígeno por parte de los individuos utilizados (Reig, 2001).

Al analizar el contenido del metal pesado al final de la experimentación, se determinó que no presentó grandes aumentos en la concentración, esto debido a la evaporación mínima del volumen de agua en cada una de las peceras.

Después, al realizar las pruebas de pH, se determinó que a medida que aumentaba la concentración de arsénico disminuían los niveles de pH, lo que quiere decir que el medio se tornó más ácido. En este caso la concentración 3 de 0,5 mg/L (concentración más alta) fue la que presentó los niveles más bajos de pH (Pereira Martín, D'ors de Blas, y Sánchez-fortún Rodríguez, 2009).

Los organismos que se utilizaron para este experimento (individuos del género *Nectopsyche*) se adaptaron rápida y fácilmente a las condiciones de laboratorio durante el tiempo de aclimatación, condiciones que fueron manipuladas para conseguir un medio similar al de su hábitat natural, en este caso el Río Alambi, además se presentaron altamente sensibles a los cambios del medio variando su comportamiento (Iannacone y Alvaríño, 2005).

A mayor concentración de arsénico y a mayor tiempo de experimentación existe una mayor tasa de mortalidad de los individuos del género *Nectopsyche*. Los índices de supervivencia por lo tanto disminuyeron, lo que se le atribuye a la relación directa con la toxicidad. En el presente estudio el número más alto de

muertes registradas se ve en las concentraciones 2 (0,1 mg/L) que es la permitida por la norma ecuatoriana y 3 (0,5 mg/L) que excede a la norma.

De igual manera la movilidad es inversamente proporcional a las concentraciones del metal, se vio que a medida que era mayor y que pasaba el tiempo de experimentación la movilidad de los individuos disminuía en gran medida. Tal y como ocurre en el estudio de Giusto, 2015 en donde los efectos negativos que se evidencian son la mortalidad y reducción de la actividad locomotora.

Los individuos que formaron parte del grupo de sobrevivientes se vieron afectados a nivel celular por la exposición a altos niveles de toxicidad. Esto se constató al realizarse las pruebas de biomarcadores. Ocurrió que, debido a las diferentes concentraciones del metal pesado, se presentó una disminución de los niveles de actividad de la enzima catalasa, glutatión libre y grupo -SH. Ya que fueron utilizadas por los organismos para prevenir la oxidación celular durante el tiempo de exposición (Soto, 2014). Los individuos que se encontraban en la concentración más alta, es decir, la concentración 3 (0,5 mg/L) de arsénico presentaron una mayor disminución de la actividad catalasa, glutatión (Sala et al., 2016) y la disminución de grupos -SH (Asgary, Naderi, Ghannady, 2005) , en comparación a las pruebas con el blanco en donde su disminución era casi imperceptible, esto significa que los individuos del género *Nectopsyche* que se encontraban en un medio sin el metal pesado no tuvieron la necesidad de hacer uso de estas enzimas ya que no se encontraban bajo un estrés.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

A mayores concentraciones del metal pesado presente en el agua, arsénico, los niveles de pH tienden a disminuir, lo que significa que el medio se torna ácido. Por lo tanto, este resulta tener un comportamiento más tóxico para los individuos del género *Nectopsyche*.

Los índices de mortalidad son mayores en las concentraciones más altas de arsénico empleado en los ensayos, específicamente en la concentración 2 (0,1 mg/L) y 3 (0,5 mg/L). El promedio de vida, por lo tanto, fue mayor en las concentraciones más bajas, 1 (0,05 mg/L), pero sobre todo en el blanco.

Los individuos del género *Nectopsyche* presentaron una reducción de su capacidad locomotora, en las concentraciones mayores de arsénico, concentración 2 (0,1 mg/L) y 3 (0,5 mg/L), los movimientos de los individuos se tornaron más tardíos y pausados en comparación al primer día de experimentación y el testigo.

Además, se logró comprobar un tipo de estrés a nivel celular en los organismos, denominado estrés oxidativo celular. Los individuos presentaron un mayor estrés en las concentraciones mayores de arsénico, esto se determinó a partir de un mayor consumo y existió una mayor actividad de las enzimas evaluadas en el presente estudio, catalasa, glutatión y grupo -SH, en las concentraciones 1, 2 y 3, como un medio de defensa empleado por los macroinvertebrados acuáticos utilizados para la experimentación.

El contenido de arsénico aceptable dentro de la Tabla 12 'Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce' del Anexo 1, del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente, es de 0,1 mg/L, en la presente

investigación al emplear dicha concentración se observaron efectos tanto letales como subletales (movilidad, biomarcadores catalasa, glutatión, grupo -SH) para los individuos del género *Nectopsyche*, por lo que se sugiere que el nivel debería estar por arriba de lo aceptable.

5.2 Recomendaciones

Es importante que en la implementación de los microcosmos se utilicen contenedores o, como en este caso, peceras que sean de vidrio y mangueras de aireación nuevas. Las peceras deben ser lavadas con jabón neutro y ácido nítrico antes de empezar con la experimentación para que las concentraciones del metal pesado y sus lecturas no se vean influenciadas por agentes ajenos al estudio.

Es primordial que antes de empezar con la experimentación, se adquiera un mayor conocimiento acerca de los riesgos a los que se puede estar expuesto con la manipulación de metales pesados, recibir capacitaciones acerca de las medidas de prevención que se pueden adoptar como el uso de guantes de nitrilo, gafas y mandil, además, conocer acerca de la forma adecuada de desecho de los materiales y agua contaminados con el metal pesado.

Tener en cuenta que los equipos con los que se van a realizar los análisis y las mediciones deben estar calibrados para evitar resultados erróneos.

Para preservar los individuos del experimento y conservar la actividad enzimática de cada uno es necesario que pasen primero por nitrógeno líquido y sean conservados a -80°C .

REFERENCIAS

- Acosta, R., Ríos, B., Rieradevall, M., y Prat N. (2009). Propuesta de un protocolo de evaluación de la calidad ecológica de ríos andinos (CERA) y su aplicación a dos cuencas en Ecuador y Perú. *Limnetica*, 28(1), 35-64. <https://doi.org/10.23818/limn.28.04>
- Aduvire, O. (2006). Tratamiento de Aguas Acidas de Mina DRENAJE ACIDO DE MINA GENERACIÓN Y TRATAMIENTO Instituto Geológico y Minero de España Dirección de Recursos Minerales y Geoambiente. Recuperado el 16 de junio de 2019 de http://info.igme.es/SIDIMAGENES/113000/258/113258_0000001.PDF
- Akerboom, T. P. M., y Sies, H. (1981). [48] *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods in Enzymology*, 373–382. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77050-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77050-2).
- Almazán-Juárez, M., Almazán-Juárez, Á., Carreto-Pérez, B. E., Hernández Castro, Elías, Damián-Nava, A., Carlos, A.-N. R., ... Carlos. (2016). Calidad y clasificación de usos del agua en la cuenca baja del río Papagayo, Guerrero, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(9), 293–305. Recuperado el 2 de febrero de 2019 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282016000300293
- Aparicio-Effen, M. (2009). Los riesgos de la contaminación minera y su impacto en los niños. *Tinkazos*, 12(27), 83–101. Recuperado el 14 de mayo de 2019 de

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1990-74512009000200005

- Arambourou, H., Beisel, J.N., Branchu, P., y Debat, V. (2012). *Patterns of Fluctuating Asymmetry and Shape Variation in Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) Exposed to Nonylphenol or Lead. Plos ONE*, 7(11), e48844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048844>
- Argota, G. y González, Y. (2013). *Enzymatic determination and heavy metals in the brain and liver in ecotoxicological model Gambusia punctata (Poeciliidae). MEDISAN*, 17(02), 221-229. Recuperado el 20 de mayo de 2019 de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=39923>
- Arias, A. R. L., Buss, D. F., Albuquerque, C. de, Inácio, A. F., Freire, M. M., Egler, M., ... Baptista, D. F. (2007). *Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1), 61–72. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232007000100011>
- Arimoro, F. O., Auta, Y. I., Odume, O. N., Keke, U. N. y Mohammed, A. Z. (2018). *Mouthpart deformities in Chironomidae (Diptera) as bioindicators of heavy metals pollution in Shiroro Lake, Niger State, Nigeria. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.074>
- Arunakumara, K., Xuecheng, Z. y Song, X. (2007). *Comparative study on bioaccumulation of lead and cadmium by the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 under laboratory conditions. Ciencias Marinas*, 33(3), 271-280. Recuperado el 23 de marzo de 2019 de https://www.researchgate.net/publication/215971223_A_comparative_study_on_bioaccumulation_of_lead_and_cadmium_by_cyanobacte

rium_Synechocystis_sp_PCC_6803_under_laboratory_conditions

Asgary, S., Naderi, GH. y Ghannady, A. (2005). *Effects of cigarette smoke, nicotine and cotinine on red blood cell hemolysis and their -SH capacity. Experimental and Clinical Cardiology* ,10(2), 116-119. Recuperado el 9 de septiembre de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2716233/>

Banco Central del Ecuador. (2014). La Minería Ecuatoriana. Recuperado el 19 de mayo de 2018 de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/cartilla00.pdf>

Banco Mundial. (2013). Minería: Resultados del sector. Recuperado el 18 de mayo de 2018 de <http://www.bancomundial.org/es/results/2013/04/14/mining-results-profile>

Betancur, Y. y Mosquera, O. (2017). Cuantificación de tioles libres y superóxido dismutasa (sod) en extractos metanólicos de plantas de las familias Asteraceae, Euphorbiaceae y Piperaceae. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(2), 117-122. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2748>

Bonilla-Martínez, O. (2010). FACULTAD LATINOAMERICANA DE CIENCIAS SOCIALES SEDE ECUADOR PROGRAMA DE ESTUDIOS DEL DESARROLLO Y TERRITORIO Agua y minería en el Quimsacocha. Recuperado el 3 de diciembre de 2018 de <http://repositorio.flacsoandes.edu.ec:8080/bitstream/10469/5853/2/TFLACSO-2013OABM.pdf>

Carlos, I., Angiorama, I., Becerra., Angiorama, C., y Becerra, F. (2010). Ancient evidence of mining and metallurgy in Pozuelos, Santo Domingo and

Coyahuayma (Puna de Jujuy, Argentina). 15(1), 81–104. Recuperado el 25 de junio de 2019 de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/bmchap/v15n1/art06.pdf>

Carmona-García, U. F., Cardona-Trujillo, H. y Restrepo-Tarquino, I. (2017). Gestión ambiental, sostenibilidad y competitividad minera. Contextualización de la situación y retos de un enfoque a través del análisis del ciclo de vida. *DYNA*, 84(201), 50. <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n201.60326>

Castro, G. y Valdés, J. (2012). *Heavy metals concentration (Cu, Ni, Zn, Cd, Pb), in biota and sediments of an artificial beach, in San Jorge bay 23°S, northern Chile. Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(2), 267–281. Recuperado el 10 de diciembre de 2018 de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-560X2012000200003&lng=en&nrm=iso

Combatt, C. E., Narváez, M. H. y Bustamante de la B, I. D. (2015). Estimación de la salinidad en aguas freáticas del área de influencia de la desembocadura del río Sinú-Córdoba, Colombia. *Idesia (Arica)*, 33(3), 55–63. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292015000300009>

Escobar-Briones, E. (2011). Efectos de las actividades humanas sobre el mar profundo: tendencias mundiales y estado actual del conocimiento en la Zona Económica Exclusiva (ZEE) de México. Recuperado el 21 de junio de 2018 de <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/703/efectos.pdf>

FAO. (2010). El estado de los recursos genéticos forestales en el mundo. Informe Nacional Ecuador. Principales amenazas que causan la pérdida de los recursos forestales. Recuperado el 14 de abril de 2019 de

<http://www.fao.org/3/i3825e/i3825e20.pdf>

Galárraga-Sánchez, R. (2019). Informe Nacional sobre la Gestión del agua en el Ecuador. Recuperado el 7 de abril de 2019 de <https://www.cepal.org/DRNI/proyectos/samtac/InEc00100.pdf>

Gamboa, M., Reyes, R. y Arrivillaga, J. (2008). Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48(2), 109-120. Recuperado el 6 de junio del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/239586192_Macroinvertebrados_bentonicos_como_bioindicadores_de_salud_ambiental

Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., y Gutiérrez, O. D. (2012). *Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments. Producción + Limpia*, 7(2), 52–73. Recuperado el 6 de junio de 2019 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552012000200005

Giusto, A. (2014). Efectos de la contaminación por metales pesados sobre anfípodos de agua dulce y su aplicación en estudios de toxicidad de sedimentos. *Fcen.Uba.Ar*. Recuperado el 2 de mayo de 2019 de https://doi.org/https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5691_Giusto.pdf

Güiza-Suárez, L. (2014). La minería manual en Colombia: Una comparación con América Latina, 35, 37–44. Recuperado el 28 de mayo de 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/bcdt/n35/n35a05.pdf>

Habeeb, A. F. S. A. (1972). *Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. Methods in Enzymology*, 25, 457–464. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(72\)25041-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(72)25041-8)

- Huamantínco, A. A., y Ortiz, W. (2010). Clave de géneros de larvas de Trichoptera (Insecta) de la Vertiente Occidental de los Andes, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(1), 75–80. Recuperado el 4 de marzo de 2019 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332010000100009
- Iannacone O., J., y Alvaríño F., L. (2005). Efecto Ecotoxicológico de tres Metales Pesados Sobre el Crecimiento Radicular de Cuatro Plantas Vasculares. *Agricultura Técnica*, 65(2). <https://doi.org/10.4067/s0365-28072005000200009>
- Iannacone Oliver, J. A., Salazar Capcha, N., y Alvaríño Flores, L. (2016). VARIABILIDAD DEL ENSAYO ECOTOXICOLÓGICO CON *Chironomus calligraphus* Goeldi (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) PARA EVALUAR CADMIO, MERCURIO Y PLOMO. *Ecología Aplicada*, 2(1–2), 103. <https://doi.org/10.21704/rea.v2i1-2.256>
- Iannacone-Oliver, J. A., Salazar-Capcha, N. y Alvaríño-Flores, L. (2003). Ecología Aplicada. *Revista Ecología Aplicada*, 2(1), 103–1100. Recuperado el 1 de junio de 2019 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162003000100016
- Juárez, J. y Villagra de Gamundi, A. (2011). Toxicidad aguda y crónica del lindano sobre *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera: Daphniidae). *Revista Peruana de Biología*, 17(3). <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i3.13>
- Krecek, J. y Horická, Z. (2006). Bosques, contaminación del aire y calidad del agua: influencia sobre la salud en las cabeceras fluviales del «Triángulo Negro» de Europa Central. *Unasyuva*, 57(49). Recuperado

el 20 de mayo de 2019 de <http://www.fao.org/3/a0789s/a0789s11.htm>

Li, Y., y Schellhorn, H. E. (2007). *Rapid kinetic microassay for catalase activity. Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 18(4), 185–187. Recuperado el 23 de marzo de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2062561/>

Lombardero Rodil, J. (2000). El mercurio y el medio ambiente. En Manual de auditoría ambiental para las actividades de beneficio de minerales auríferos (3.^a ed.). Quito, Ecuador: Corporación OIKOS

Londoño-Franco, L. F., Londoño Muñoz, P. T., y Muñoz García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)145-153)

López-Sánchez, L. M., López-Sánchez, M. L., y Medina-Salazar, G. (2017). La prevención y mitigación de los riesgos de los pasivos ambientales mineros (PAM) en Colombia: una propuesta metodológica. *ENTRAMADO*, 13(1), 78–91. <https://doi.org/10.18041/entramado.2017v13n1.25138>

Martínez Arias, L, Panizo García, S, Carrillo López, N, Barrio Vázquez, S, Quirós González, I, Román García, P, ... Naves Díaz, M. (2017). Efecto de la enzima antioxidante catalasa en la calcificación vascular y desmineralización ósea. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 9(1), 13–19. <https://doi.org/10.4321/s1889-836x2017000100003>

Massol, A. (2018). Parámetros físico-químicos: pH. Recuperado el 27 de mayo de 2018 de <https://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p2-ph.pdf>

- Mendizabal, M. (2010). Contaminación del agua. Revista Virtual REDESMA, 5. Recuperado el 4 de julio de 2019 de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1995-10782010000300002&lng=es&nrm=iso
- Mendoza-Rodríguez, R. (2019). Toxicidad aguda del cobre (Cu²⁺) en postlarvas de camarón de río *Cryphiops caementarius* (Natantia, Palaemonidae). *Revista Peruana de Biología*, 14(1), 53–54. Recuperada el 1 de noviembre de 2018 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000200012
- Ministerio de Hidrocarburos. (2018). ARCOM socializa normas y sanciones estipuladas en el COIP para la explotación ilegal de minerales. Recuperado el 16 de junio de 2018 de <https://www.hidrocarburos.gob.ec/arcom-socializa-normas-y-sanciones-estipuladas-en-el-coip-para-la-explotacion-ilegal-de-minerales/>
- Ministerio de Minería. (2018). *Strategic Mining Project*. Recuperado el 20 de mayo de 2018 de <https://www.mineria.gob.ec/wp-content/uploads/2018/03/Strategic-Mining-Projects-2018.pdf>
- Ministerio de Minería. (2019). Sulfuros. Recuperado el 31 de marzo de 2019 de <http://www.minmineria.gob.cl/glosario-minero-s/sulfuros/>
- Ministerio del Ambiente. (2016). Texto Unificado de la Legislación Ambiental (TULSMA). Libro VI de la Norma de Calidad Ambiental. Anexo 1. Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso agua. Recuperado el 3 de mayo de 2019 de <http://www.silec.com.ec/bibliotecavirtual.udla.edu.ec/WebTools/Lexis>

Finder/DocumentVisualizer/DocumentVisualizer.aspx?id=AMBIENTE

-

TEXTO_UNIFICADO_DE_LEGISLACION_SECUNDARIA_DE_MEDI
O_AMBIENTE&query=TULSMA#I_DXDataRow900

MMSD. (2002). Minerales y Desarrollo Económico. Informe Borrador para Comentario Público del Proyecto Minería, Minerales y Desarrollo Sustentable. Recuperado el 1 de septiembre de 2018 de <https://pubs.iied.org/pdfs/G00978.pdf>

Morales-Cabrera, D., Avendaño-Cáceres, E., Zevallos Ramos, D., Fernández Prado, J., Mendoza Rodas, Z. y Torres Ventura, A. (2017). Arsénico total no deseado ante valores referenciales de ph en agua superficial, cuenca hidrográfica sama, Región Tacna-Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 19(3), 305–312. <https://doi.org/10.18271/ria.2017.295>

Oviedo-Anchundia, R., Moina-Quimí, E., Naranjo-Morán, J. y Barcos-Arias, M. (2017). Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera. *Bionatura*, 2(4), 437–441. <https://doi.org/10.21931/rb/2017.02.04.5>

Pedrozo, F., Díaz, M. y Temporetti, P. B. G. (2010). Características limnológicas de un sistema ácido: Río Agrio-Lago Caviahue, Provincia del Neuquén, Argentina. *Ecología Austral*, 20(2), 173–184. Recuperado el 2 de junio de 2018 de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2010000200008

Pereira-Martín, M., D'ors de Blas, A., y Sánchez-fortún Rodríguez, S. (2009). Influencia del pH sobre el efecto tóxico inducido en clones de *Dictyosphaerium Chlorelloides* sensibles y resistentes a Cromo

(VI). *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 3(2), 22-30.
<https://doi.org/>-

Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R. y Castrillo M. (2008). Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Revista Interciencia*, 33(2), 112-119. Recuperado el 25 de mayo de 2019 de <http://www.redalyc.org/pdf/339/33933205.pdf>

POSTGRAU. (2011). Métodos Cuantitativos. Recuperado el 21 de julio de 2019 de <https://www.uv.es/mlejarza/actuariales/EAA/EAA2.pdf>

PRAS. (2019). Explotación Minera. Programa de Reparación Ambiental y Social. Recuperado el 14 de abril de 2019 de <http://pras.ambiente.gob.ec/web/siesap/informacion-em>

Prieto-Díaz, V. y de Villa Pérez A. (1999). La contaminación de las aguas por hidrocarburos: un enfoque para abordar su estudio. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 37(1), 13–20. Recuperado el 2 de marzo de 2019 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30031999000100003

Ramos, R., Bastidas, C. y García E. (2012). Ensayos de toxicidad con sedimentos marinos del occidente de Venezuela. *Ciencias Marinas*, 38(1), 119–127. Recuperado el 7 de marzo de 2019 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-38802012000100009&script=sci_abstract

Reig, A. (2001). Influencia de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y consumo de oxígeno de la dorada (*Sparus aurata* L.). Recuperado el 12 de mayo de 2019 de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/777/TOL7101.pdf>

- Ricardo, A. (2017). Política minera y sostenibilidad ambiental en Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1(2), 41–52. Recuperado el 6 de julio de 2019 de <http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/RevFIG/article/view/68>
- Ringuelet, R. (1999). *Chironomidae as quality indicators of freshwater environments*. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 58(1–2). Recuperado el 2 de febrero de 2019 de <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/32770>
- Roldán-Pérez, G. (2016). Los macroinvertebrados como bioindicadores de la calidad del agua: cuatro décadas de desarrollo en Colombia y Latinoamérica. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 254. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.335>
- Romero-Peñuela, M., Uribe-Velásquez, L. y Sánchez-Valencia, J. (2011). *Stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming*. *Biosalud*, 10(1), 71-87. Recuperado el 2 de febrero de 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v10n1/v10n1a07.pdf>
- Ruiz-Huerta, E. y Armienta Hernández, M. (2012). *Accumulation of arsenic and heavy metals in maize near mine tailings*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(2), 103–117. Recuperado el 6 de enero de 2019 de <http://www.redalyc.org/pdf/370/37023178001.pdf>
- Sala, M., Faria, M., Sarasúa, I., Barata, C., Bonada, N., Brucet, S., ... Cañedo-Arguelles, M. (2016). *Chloride and sulphate toxicity to *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera, Hydropsychidae): Exploring intraspecific variation and sub-lethal endpoints*. *Science of The Total Environment*, 566–567, 1032–1041.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.121>

Secretaría de Educación Superior, Ciencia. (2015). Prometeos investigan la acidificación en mares ecuatorianos | Prometeo. Recuperado el 21 de junio de 2018 de <http://prometeo.educacionsuperior.gob.ec/prometeos-investigacion-la-acidificacion-en-mares-ecuatorianos/>

SENAGUA. (2012). Diagnóstico de las estadísticas del agua en Ecuador, Informe Final. Recuperado el 7 de abril de 2019 de <https://aplicaciones.senagua.gob.ec/servicios/descargas/archivos/download/Diagnostico%20de%20las%20Estadisticas%20del%20Agua%20Producto%20Ilc%202012-2.pdf>

Silva, J. dos S., Rocha, I. K. B. dos S., Freitas, L. C. de, Pereira, N. J., y Carvalho Neta, R. N. F. (2015). Principios bioéticos aplicados en estudios ecotoxicológicos acuáticos. *Revista Bioética*, 23(2), 409–418. <https://doi.org/10.1590/1983-80422015232079>

Silva, J., Fuentealba, C., Bay-Schmith, E. y Larrain, A. (2007). Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana* (Concepción), 71(2). <https://doi.org/10.4067/s0717-65382007000200001>

Sironi O. (2013). El impacto de los medios de producción minera en los Paramillos de Uspallata (Mendoza, Argentina): Un acercamiento histórico en la larga duración (siglos XVII-XIX). *Revista de historia americana y argentina*, 48 (1). <https://doi.org/2314-1549>

Sobrero, M. C. (2010). Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo). Universidad Nacional de la

Plata. Edu. Ar. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/10915/5246>

- Solís-Castro, Y., Zúñiga-Zúñiga, L. A., y Mora-Alvarado, D. (2018). La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y nacientes de Costa Rica. *Revista Tecnología En Marcha*, 31(1), 35. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3495>
- Soto C. (2014). *Application of biomarkers as a tool for assessment of contamination in fish farm effluents. Sustainability, Agriculture, Food and Environmental Research*, 2(2), 18-32. Recuperado el 4 de noviembre de 2018 de <http://portalrevistas.uct.cl/index.php/safer/article/download/756/670>
- Springer M. (2010). Trichoptera. *Revista de Biología Tropical*, 58(4), 151-158. Recuperado el 4 de mayo de 2019 de <https://www.redalyc.org/toc.oa?id=449&numero=22967>
- Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Luna Azul*, (32), 121–127. Recuperado el 17 de febrero de 2019 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1909-24742011000100011&script=sci_abstract&tlng=es
- USGS. (2018). *pH and Water*. Recuperado el 31 de marzo de 2019 de https://www.usgs.gov/special-topic/water-science-school/science/ph-and-water?qt-science_center_objects=0#qt-science_center_objects
- Walteros-Rodríguez, J., Castaño Rojas, J. y Marulanda Gómez, J. (2016). Ensamble de macroinvertebrados acuáticos y estado ecológico de la microcuenca Dalí-Otún, Departamento de Risaralda, Colombia. *Hidrobiológica*, 26 (3), 359-371. Recuperado el 30 de mayo de 2019 de https://www.researchgate.net/profile/Jeymmy_Walteros-

Rodriguez/publication/316148298_Ensamble_de_macroinvertebrados_acuaticos_y_estado_ecologico_de_la_microcuenca_Dali-Otun_Departamento_de_Risaralda_Colombia_Aquatic_macroinvertebrate_assemblages_and_ecological_state_of_Dali_sub-basin_/links/59a14a83a6fdcc1a314cfb1d/Ensamble-de-macroinvertebrados-acuaticos-y-estado-ecologico-de-la-microcuenca-Dali-Otun-Departamento-de-Risaralda-Colombia-Aquatic-macroinvertebrate-assemblages-and-ecological-state-of-Dali-sub-basi.pdf

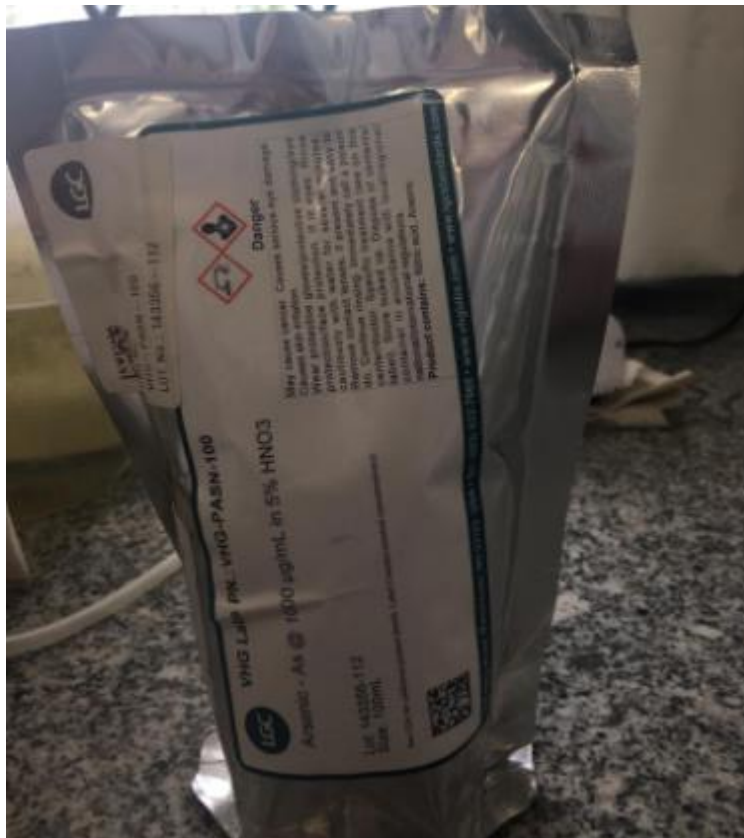
World Health Organization. (2019). Agua para la salud: un derecho humano. Recuperado el 30 de marzo de 2019 de <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/pr91/es/>

Zamora-Muñoz, C., Sáinz-Bariáin, M. y Bonada N. (2015). Orden Trichoptera. *Revista IDE@ -SEA*, 64, 1–21. Recuperado el 4 de noviembre de 2018 de http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_64.pdf

ANEXOS



Anexo 1. Punto de recolección de los individuos del género *Nectopsyche*, Río Alambi



Anexo 2. Estándar utilizado de arsénico

