



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

***“EFECTO TÓXICO AGUDO DEL CROMO
HEXAVALENTE ANTE VARIACIONES DE pH,
SOBRE ZOOPLACTON MARINO (*Artemia
franciscana*)”***

T E S I S

Para obtener el grado de:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:
P.Q.F.B. MONICA RUIZ HERNANDEZ

Asesor:
D.C. MA. CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO

Co-asesor:
M.C. ALONDRA ALELIE CORTÉS TÉLLEZ



Morelia, Michoacán Junio, 2016

DEDICATORIA

Esta investigación la dedico con todo mi cariño y respeto infinito a mi familia. Especialmente a mis amorosos padres quienes desde pequeña me han apoyado y guiado absolutamente en todas y cada una de las metas que me he propuesto, además de encaminarme hacia nuevos objetivos.

A mis hermanitos: Adolfo, Armando, Alberto, Fabián, Leonardo y Ma. Guadalupe, se las dedico desde el fondo de mi alma.

A mi novio Uriel que siempre me alentó a continuar y mantenerme firme cuando creía que me rendía, por toda esa paciencia que ha tenido conmigo, por ser parte de las etapas más importantes en mi vida y por orientarme hacia un futuro de superación y estudio.

Y a todas aquellas personas quienes siempre estuvieron en los momentos que las necesite y que juntos logramos hacer realidad uno de mis más grandes sueños.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios porque a ti he podido concluir un ciclo maravilloso y muy grande en mi vida, gracias por todas las bendiciones que me has dado y por lo que ahora soy. A mi hermosa Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo la cual llevo en el corazón siempre, que me dio todo y abrió sus puertas del conocimiento para mí. A mi maravillosa Facultad de Químico Farmacobiología hogar de muchos que como yo eligieron esta extraordinaria profesión y que con mucho orgullo, amor, pasión y respeto representaré.

A mis asesoras de tesis: Dra. Carmen y M.C. Alondra mi agradecimiento especial por darme esta gran oportunidad, por la confianza que depositaron en mí, por sus consejos, paciencia y conocimientos durante todo este trayecto. Pase momentos muy agradables a su lado y sin ustedes no hubiera sido esto posible. Las admiro profundamente, dios las bendiga siempre.

A mis sinodales por sus observaciones y tiempo dedicado, además de su profesionalismo que ayudo mucho para mejorar mi trabajo.

A mis padres Leonardo y Francisca, mis motores, mi fuente de inspiración, quienes con su amor y apoyo incondicional me impulsaron día a día para que luchara por mis sueños, son lo más valioso que tengo.

A mis hermanitos, por sus palabras de aliento y apoyo en todos los momentos difíciles, ustedes le dan alegría y sentido a mi vida.

A tí Uriel por ser una de las personas más importantes en mí vida, eres esa inspiración extra que necesite siempre para motivarme a seguir adelante. Eres mi universo y espero que esto sea solo el comienzo de muchos éxitos que compartiremos juntos.

A ustedes amigos, por todos esos buenos momentos que compartieron a mi lado, fueron de gran ayuda cuando pasaba por situaciones emocionales tan difíciles, y que nunca me dejaron sola, saben que ocupan un lugar muy importante en mi corazón. Les agradezco tanto por formar parte de este proceso tan bonito.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VI
GLOSARIO	VII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	4
2.2 CONTAMINACIÓN QUÍMICA POR METALES PESADOS	5
2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES, PRODUCCIÓN Y USOS DEL CROMO	7
2.4 DICROMATO DE POTASIO: Sustancia de ensayo	8
2.4.1 Descripción y características generales:	8
2.4.2 Estructura y propiedades fisicoquímicas:	9
2.4.3 Síntesis:	9
2.5 INCORPORACIÓN DEL CROMO EN EL MEDIO AMBIENTE	9
2.6 DESTINO MEDIOAMBIENTAL DEL CROMO	11
2.7 IMPACTO DEL CROMO EN EL MEDIO ACUÁTICO	13
2.8 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL CROMO	14
2.9 EFECTOS TÓXICOS GENERALES DEL CROMO SOBRE LA SALUD HUMANA	16
2.10 LEGISLACIÓN.....	17
2.11 LA INVESTIGACIÓN ECOTOXICOLÓGICA: BIOENSAYOS COMO HERRAMIENTA	20
2.12 BIOINDICADORES	23
2.13 CICLO DE VIDA DEL GÉNERO <i>ARTEMIA</i>	26
2.14 <i>Artemia franciscana</i> : ORGANISMO DE PRUEBA.....	31
3. HIPÓTESIS	33
4. JUSTIFICACIÓN	33
5. OBJETIVO GENERAL	34
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	34
6. MATERIAL Y MÉTODOS	35
6.1 Agua marina sintética.....	35
6.2 Material biológico	35
6.3 Sustancia de ensayo.....	36

6.4 Determinación de la toxicidad aguda del Dicromato de potasio en nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	36
6.5 Valoración del riesgo toxicológico del dicromato de potasio sobre <i>Artemia franciscana</i> ante la variación de pH.....	36
6.6 Determinación del balance de O ₂ en concentraciones sub letales del dicromato de potasio, sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	37
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
8. RESULTADOS	38
8.1 LC ₅₀₍₂₄₎	38
8.2 LC ₅₀₍₇₂₎	39
8.2.1 Comparación de LC ₅₀ de 24 h y 72 h del dicromato de potasio sobre <i>A. franciscana</i>	40
8.3 Variación de la toxicidad del Dicromato de potasio por cambios en pH a 24 h	41
8.3.1 pH 4.5.....	41
8.3.2 pH 5.0.....	42
8.3.3 pH 5.5.....	43
8.3.4 pH 6.0.....	44
8.4 Estudio de la LC ₅₀ a 72 h con diferentes pH.....	45
8.4.1 pH 4.5.....	45
8.4.2 pH 5.0.....	46
8.4.3 pH 5.5.....	46
8.4.4 pH 6.0.....	47
8.5 COMPARACIÓN 24 h Y 72 h CON RESPECTO A LA VARIACIÓN DE pH.....	49
8.5.1 24 h.....	49
8.5.2 72 h.....	51
8.6 Cinética del balance de O ₂ en <i>A. franciscana</i>	54
9. DISCUSIÓN.....	56
9.1 LC ₅₀ de Cr en especies acuáticas.....	56
9.2 Variación de la toxicidad del dicromato de potasio ante cambios de pH	59
9.3 Estudios de inhibición de oxígeno causado por exposiciones de cromo en organismos acuáticos.....	62
10. CONCLUSIONES.....	64
11. RECOMENDACIONES	64
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los metales (Bautista, 1999).	6
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del dicromato de potasio (UNAM, 2007)	9
Tabla 3. Industrias en México destinadas al uso y explotación del cromo y sus derivados (Rangel & Maldonado, 2014).	18
Tabla 4. Límites máximos permisibles de exposición de Cr ⁺⁶ en diversos países (Department of Health and Human Services, 2013).	19
Tabla 5. Límites máximos permisibles para cromo total en cuerpos de aguas mexicanas.	20
Tabla 6. Criterios para la selección de bioensayos en el laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas (Ramirez & Mendoza, 2008).	23
Tabla 7. Clasificación taxonómica del genero <i>Artemia</i> (Rivera, 2013).	26
Tabla 8. Especies que conforman el género <i>Artemia</i> (Abreu-Grobois & Beardmore, 1980; FAO, 2015).	27
Tabla 9. Parámetros para una óptima eclosión de nauplios de <i>A. franciscana</i> .	35
Tabla 10. Valores de LC ₅₀₍₂₄₎ del dicromato de potasio.	38
Tabla 11. Valores de LC ₅₀₍₇₂₎ del dicromato de potasio.	39
Tabla 12. Resultados de la prueba T-student de LC ₅₀₍₂₄₎ Vs LC ₅₀₍₇₂₎	40
Tabla 13. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 4.5 ...	41
Tabla 14. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5	42
Tabla 15. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5 ...	43
Tabla 16. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6.	44
Tabla 17. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 4.5 ...	45
Tabla 18. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.	46
Tabla 19. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5 ...	47
Tabla 20. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6.	48
Tabla 21. Resultados ANOVA de la comparación de las LC ₅₀ obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 24 h.	50
Tabla 22. Resultados de Test Tukey del dicromato de potasio ante variación de pH a 24 h.	51
Tabla 23. Resultados de Test de Dunnett del dicromato de potasio con respecto al pH control a 24 h.	51
Tabla 24. Resultados ANOVA de la comparación de las LC ₅₀ obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 72 h.	53
Tabla 25. Resultados de Test Tukey del dicromato de potasio ante variación de pH a 72 h de exposición.	53
Tabla 26. Resultados de Test de Dunnett del dicromato de potasio con respecto al pH control a 72 h de exposición.	54
Tabla 27. LC ₅₀ del Cr en organismos acuáticos.	57

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES, DIAGRAMAS Y GRÁFICOS

Ilustración 1. Tipos de contaminación y contaminantes.....	5
Ilustración 2. Dicromato de Potasio (Silva, 2011)	8
Ilustración 3. Estructura química del dicromato de potasio. (Silva, 2011).....	9
Ilustración 4. Mecanismo de acción del cromo sobre la actividad de la insulina (Vincent, 2000).....	16
Ilustración 5. Característica anatómicas de <i>Artemia</i> (Rivera, 2013)	27
Ilustración 6. Morfología de quiste <i>Artemia</i> (Devull, 2014)	28
Ilustración 7. Eclosión de quiste de <i>Artemia</i> (Neli, 2015).	29
Ilustración 8. Diferencias anatómicas entre macho y hembra de <i>Artemia</i> . (Aquatikos, 2013).....	30
Ilustración 9. Reproducción sexual de <i>Artemia</i> (Kenyifish, 2015).	30
Ilustración 10. Ciclo de vida de <i>Artemia</i> (Jara, 2014).	31
Diagrama 1. Procedimiento para la preparación de agua marina sintética.	35
Gráfico 1. Curva Concentración-Respuesta del dicromato de potasio a 24 h de exposición sobre <i>A. franciscana</i>	38
Gráfico 2. Curva Concentración-Respuesta del dicromato de potasio a 72 h de exposición sobre <i>A. franciscana</i>	39
Gráfico 3. Comparación de curvas Concentración-Respuesta a 24 y 72h del dicromato de potasio.....	40
Gráfico 4. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 4.5.....	41
Gráfico 5. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.....	42
Gráfico 6. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5.....	43
Gráfico 7. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6.....	44
Gráfico 8. Curva concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 4.5.....	45
Gráfico 9. Curva Concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.....	46
Gráfico 10. Curva Concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5.....	47
Gráfico 11. Curva Concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6.....	48
Gráfico 12. Comparación de las LC ₅₀ obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 24 h de exposición del dicromato de potasio.....	49
Gráfico 13. Comparación de las LC ₅₀ obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 72 h de exposición del dicromato de potasio.....	52

Gráfico 14. Cinética del dicromato de potasio.....	54
Gráfico 15. Porcentaje de inhibición de O ₂ ante exposición del dicromato de potasio a 120min.....	55

ABREVIATURAS

cm: centímetros

EPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos

FAO: Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos

FTG: Factor de tolerancia a la glucosa

g: gramos

h: horas

IC: Concentración inhibitoria

LOEC: Concentración mínima con efecto observado

lux: unidad de iluminación

M: concentración molar

mg/L: miligramos por litro

min: minutos

mL: mililitros

nmol: nanomol

NOEC: Concentración máxima sin efecto observado

ppm: partes por millón

PSII: Fotosistema II

s: segundos

µg: microgramos

µL: microlitros

µm: micras

GLOSARIO

Bioacumulacion. Se refiere al proceso de almacenamiento de un contaminante en un organismo o una comunidad biológica debida a la captación directa desde el agua y/o por ingestión.

Bioconcentracion. Es el proceso por el cual los organismos, especialmente los acuáticos, pueden absorber y concentrar sustancias, directamente del medio que les rodea, a través de su superficie respiratoria y de su piel.

Biodisponibilidad. Es un término que indica la velocidad y la cantidad de alguna sustancia que alcanza intacta a la circulación general de cualquier ser vivo.

Biomagnificacion. Se define como la acumulación y la transferencia de sustancias a través de la cadena alimenticia, produciéndose un aumento de las concentraciones internas en los organismos situados en los niveles más altos de la cadena trófica.

Carcinogénico. Es un agente físico, químico o biológico potencialmente capaz de producir cáncer al exponerse a tejidos vivos.

Concentración letal. Es la concentración de tóxico estimada que produce la muerte de una proporción específica de los organismos de prueba. Se define como la concentración letal media (CL₅₀), que corresponde a la concentración que mata al 50% de los organismos expuestos en un determinado periodo de tiempo.

Contaminante. Una sustancia que se encuentra en un medio al cual no pertenece o que lo hace a niveles que pueden causar efectos (adversos) para la salud o el medio ambiente.

Ecosistema acuático. Es la unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí y de estos con el ambiente acuático en un espacio y tiempo determinado, que puede ser cualquier cuerpo de agua, como: mares, océanos, ríos, lagos, pantanos y demás fuentes. Los dos tipos más destacados son los ecosistemas marinos y los ecosistemas de agua dulce.

Ecosistema. Es un sistema natural que está formado por un conjunto de organismos vivos (biocenosis) interdependientes y el medio físico en donde se relacionan, llamado hábitat. Los ecosistemas suelen formar una serie de cadenas tróficas que muestran la interdependencia de los organismos dentro del sistema.

Ecotoxicología. Ciencia que estudia el destino y los efectos de los contaminantes en los ecosistemas, intentando explicar las causas y prever los riesgos probables. La ecotoxicología prospectiva evalúa la toxicidad de las sustancias antes de su producción y uso. La ecotoxicología retrospectiva se ocupa de confirmar si la sustancia produce daños en el ecosistema.

Factores Abióticos. Son los distintos componentes que determinan el espacio físico en el cual habitan los seres vivos; entre los más importantes podemos encontrar: el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo, la humedad, el oxígeno y los nutrientes.

Factores Bióticos. Son todos los organismos que tienen vida. Pueden referirse a la flora, la fauna, de un lugar y sus interacciones.

Genotóxico. Es la capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.

Lixiviación. Fenómeno de desplazamiento de sustancias solubles o dispersables (arcilla, sales, hierro, humus) causado por el movimiento de agua en el suelo, y es por lo tanto, característico de climas húmedos. Esto provoca que algunas capas del suelo pierdan sus compuestos nutritivos, se vuelvan más ácidas y a veces también se origine toxicidad.

Mutagénico. Es cualquier agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.

Teratógeno. Es una sustancia, agente físico o químico u organismo capaz de provocar un defecto congénito (malformación) durante la etapa reproductiva de algún organismo.

Toxicidad. Propiedad que tiene una sustancia, elemento o compuesto de causar daños en la salud humana o la muerte de un organismo vivo.

Tóxico. Agente capaz de producir un efecto adverso, dañando la estructura y el funcionamiento del ecosistema.

Xenobiótico. Deriva del griego *xeno* ('extraño') y *bio* ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados artificialmente por el ser humano.

RESUMEN

El potencial impacto que representa para el ambiente acuático la emisión de cromatos y dicromatos vertidos como producto de la actividad de diferentes sectores industriales, precisa de estudios ecotoxicológicos constantes. En la presente tesis se realizó un bioensayo de ecotoxicidad aguda utilizando a *Artemia franciscana* como bioindicador debido a que es un ensayo rápido, de alta confiabilidad y de bajo costo por lo que es ampliamente recomendable en pruebas toxicológicas, sobre todo como alternativa ante las actuales demandas para evitar los estudios de toxicidad *in vivo*. En esta investigación se determinaron las LC_{50} a las 24 h y 72 h de exposición del cromo, empleando como sustancia de referencia el dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$, posteriormente se estimó el comportamiento tóxico debido a la variación de pH del medio en un rango de 4.5-6.5 y como control un valor de 8. Asimismo, se estudió el efecto en la cinética de oxígeno debido a la exposición basada en la $LC_{50(24)}$ control del cromo sobre el mismo bioindicador.

Obteniéndose los siguientes resultados: la fase correspondiente a 72 h (LC_{50} de 16.50 mg L^{-1}), evidenció una toxicidad superior a menor concentración, seguida en la respuesta de mortalidad a 24 h (LC_{50} de 30.50 mg L^{-1}). Posteriormente en los ensayos ante variaciones de pH, los resultados revelaron que a valores de pH más ácidos esta sustancia requiere una concentración menor para causar efecto tóxico, siendo los nauplios de 72 h de *Artemia franciscana* los que presentan una mayor sensibilidad. Por último el estudio cinético del balance de oxígeno en el bioindicador evidencia un porcentaje de inhibición de nmolO_2/mL de muestra: de $58.37\% \pm 1.357$, lo cual indica que al aumentar el tiempo de exposición, se incrementa el déficit de oxígeno. Por lo tanto este metal resulta ser peligroso para el zooplancton, lo cual pone en riesgo los niveles tróficos superiores, pudiéndose ocasionar un desequilibrio en el ecosistema.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, Cromo hexavalente, Ecotoxicología, pH ácido, inhibición de oxígeno.

ABSTRACT

The potential impact posed to the aquatic environment the emission of chromates and dichromates discharges as a result of the activity of different industrial sectors, requires constant ecotoxicological studies. In this thesis, a bioassay of acute ecotoxicity using *Artemia franciscana* as a bioindicator because it is a rapid assay, high reliability and low cost so it is widely recommended in toxicological tests, especially as an alternative to the current held demands to avoid toxicity studies *in vivo*. In this investigation were determined the LC₅₀ at 24 h and 72 h exposure chromium using as reference substance potassium dichromate K₂Cr₂O₇, then the toxic behavior was estimated due to the variation in pH of the medium in a range of 4.5-6.5 and as a control value of 8. Also, the effect on the kinetics of oxygen due to exposure based on the LC₅₀ (24) control on it bioindicator chromium was studied.

It obtaining the following results: the phase corresponding to 72 h (LC₅₀ 16.50 mg L⁻¹), showed a lower concentration than toxicity, followed in response to 24 h mortality (LC₅₀ 30.50 mg L⁻¹). Later in trials to changes in pH, the results revealed that more acidic pH values of this substance requires a lower concentration to cause toxic effect, being 72 h nauplii *Artemia franciscana* those with greater sensitivity. Finally the kinetic study of oxygen balance in the biomarker evidence a percentage inhibition of nmolO₂ / mL sample: from 58.37% ± 1.357, indicating that increasing the exposure time, oxygen deficiency increases. Therefore this metal turns out to be dangerous for zooplankton, which puts at risk the higher trophic levels, being able to cause an imbalance in the ecosystem.

Keywords: *Artemia franciscana*, hexavalent chromium, ecotoxicology, acid pH, oxygen inhibition.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las problemáticas ambientales emergentes en el país se refiere al uso indiscriminado de productos químicos en diversas actividades industriales, lo cual se traduce a riesgos sanitarios y ambientales importantes (CONAGUA, 2014). Lo anterior, ha llevado a que la contaminación química en especial por metales pesados, constituya una de fuentes de mayor riesgo para los ecosistemas acuáticos y las especies presentes en ellos (Mancera & Alvarez, 2006).

Estos ecosistemas complejos por sus características únicas albergan a un gran número de organismos (Alvarez & Celis, 1982), que por su ubicación, sirven como asentamientos urbanos, portuarios e industriales, y desafortunadamente son empleados como áreas de vertimiento de desechos.

El transporte de los metales en los recursos hidrológicos, es principalmente controlado por procesos de transformación física, química y biológica de los compuestos que estos elementos forman (Herrera, et al., 2012). Las reacciones ocurren muchas veces en forma simultánea e incluyen:

- Intercambio iónico
- Adsorción- desorción
- Formación de complejos
- Coagulación
- Biodegradación
- Precipitación-disolución
- Oxidación-reducción
- Fotólisis e hidrólisis

Estas reacciones ilustran la complejidad de las transformaciones de los contaminantes en el ambiente natural donde los sedimentos y las reacciones que ocurren en la interfase partícula-agua juegan un papel muy importante en el traslado

de sustancias tóxicas, debido a que muestran una alta afinidad a la materia particulada y orgánica presente (Hansen, et al., 1995).

Especialmente los contaminantes metálicos del ecosistema marino son estrictamente dependientes de la capacidad de complejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno. Los metales son especies químicas no degradables. Por tal motivo, una vez vertidos al medio, se distribuyen en los entornos aire -agua -suelo, en algunos casos cambiando su estado de oxidación, o incorporarse a los seres vivos. Por lo tanto su peligrosidad depende de su concentración en el medio y de su combinación con compuestos presentes en los sedimentos costeros y su ingreso a las cadenas alimentarias, donde pueden ocurrir procesos de bioconcentración, bioacumulación y posteriormente biomagnificación (Ponce & Vazquez, 1991). Otros factores como el pH, la cantidad de organismos presentes y la concentración o tipo de aguas residuales también pueden afectar en cierto grado la toxicidad de los metales. Actualmente es insuficiente el conocimiento que se tiene sobre los efectos generados por la disposición en los cuerpos de agua y su impacto sobre el recurso hídrico y el deterioro de ecosistemas marinos (Albek, et al., 1997).

Existe una extensa aplicación en diferentes sectores industriales en las cuales destacan: la producción de pinturas, galvanotecnia y procesos de curtido de pieles, definidas como las actividades que registran gran cantidad de desechos generados por cromo, uno de los principales metales pesados clasificado como contaminante acuático. El impacto ambiental es ocasionado cuando este compuesto es desechado sin tratamiento alguno a los sistemas acuáticos donde se disocia, en forma de ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) que a su vez por medio de reacciones de óxido reducción genera cromo hexavalente provocando graves problemas de ecotoxicidad (Fahim, et al., 2007), ya que potencia su actividad tóxica para las especies con las que entra en contacto (Khwaja, 1998). Ante la problemática anteriormente planteada el objetivos del presente trabajo, fue evaluar el efecto del Cr (VI), sobre un bioindicador perteneciente al primer nivel trófico de ecosistemas salinos -*Artemia franciscana*, microcrustáceo, altamente sensible debido a que tiene

la capacidad de mostrar en espacios de tiempo reducidos efectos tóxicos de diversas sustancias, en comparación con los demás existentes en el medio, por lo que son bioindicadores importantes que nos ayudan a medir niveles de contaminación. Por la facilidad de cultivo, corto ciclo de vida y su distribución cosmopolita, *Artemia* ha ganado popularidad como organismo de prueba en estudios de toxicología por la posibilidad de obtener organismos neonatos de forma sincrónica y con una condición biológica uniforme, y sobretodo ser una alternativa al uso de otros bioensayos *in vivo* (Papadopoulos, et al., 2004).

Las características anteriormente señaladas son de suma importancia por la diversidad climática que presenta nuestro país, adaptándose como indicador ambiental ideal para el estudio de diversas zonas (Panagoula, et al., 2002).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación ambiental siempre ha existido ya que, en parte, es inherente a las actividades del ser humano. Sin embargo, en años recientes se le ha prestado mayor atención ya que ha aumentado la frecuencia y gravedad de los acontecimientos de contaminación en todo el mundo y cada día hay más pruebas de sus efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud (Flores, et al., 1995).

Los efectos más graves de la contaminación ocurren cuando la entrada de sustancias (naturales o sintéticas) al ambiente rebasa la capacidad de los ecosistemas para ser asimiladas y/o degradarlas. Aunque los casos de contaminación se iniciaron a finales del siglo XVII, durante la revolución industrial, sus impactos se agravaron considerablemente en la Segunda Guerra Mundial, así como con la extracción, producción y usos de diversas sustancias tanto naturales como artificiales para las cuales los mecanismos de asimilación o degradación han sido superados o no existen (PNUMA, 1984; Meadows, et al., 1992).

Hay muchas definiciones de contaminación ambiental pero para fines prácticos Albert (1997) la define como *la “Introducción o presencia de sustancias, organismos o formas de energía ambientales o sustratos a los que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de dichos sustrato, por un tiempo suficiente, y bajo condiciones tales que esas sustancias interfieren con la salud y dañan a los recursos naturales o alteran el equilibrio ecológico de la zona”*.

De acuerdo a lo anterior, podemos encontrar diversos tipos de contaminación de acuerdo a su origen, efectos, clases y fuentes de contaminantes.



Ilustración 1. Tipos de contaminación y contaminantes.

Los diferentes tipos de contaminación dependen de determinados factores que afectan distintamente a cada ambiente, y es la contaminación química en especial por metales pesados la que constituye una de las más peligrosas para los ecosistemas acuáticos y las especies que los conforman.

2.2 CONTAMINACIÓN QUÍMICA POR METALES PESADOS

La corteza terrestre contiene gran variedad de elementos químicos, entre ellos muchos metales que desde tiempos remotos, han resultado de gran importancia para el desarrollo y progreso de las civilizaciones. De los elementos químicos que hoy conocemos, aproximadamente un 75 % son metales (Schinitman, 2004). Y muchos de ellos son necesarios para los seres vivos en cantidades traza, al ejercer funciones biológicas importantes y de acuerdo a esto, se les encuentra clasificados en dos grupos: esenciales y no esenciales (Tabla 1). El criterio más relevante que se utiliza para esta clasificación es que la ausencia de un elemento esencial puede provocar una deficiencia específica que puede ser reversible al introducir el elemento en particular (Batley & Florence, 1976). Así mismo, los metales

considerados elementos traza esenciales son necesarios para el perfecto desarrollo de los organismos, tanto de plantas como animales, pero cuando superan los límites de concentración necesarios, pasan a tener un efecto tóxico sobre el organismo que inclusive en la mayoría de los casos llega a ser letal (Reinhold, 1975; Alarcon, 2009). Por lo tanto, se debe de considerar un equilibrio en la cantidad que es ingresada (Huang et al., 2016). Ya que pueden alterar los niveles de concentración de otros metales presentes en los seres vivos por que intervienen en sitios de competición de los centros activos de muchas moléculas que son necesarios para realizar infinidad de actividades metabólicas que poseen elevada trascendencia biológica, por mencionar que funcionan como cofactores y que son componentes integrales de diversas enzimas para que estas sean biológicamente activas (Fu & Wang, 2011).

Tabla 1. Clasificación de los metales (Bautista, 1999).

Esenciales (fisiológicos)	No esenciales
Zinc	Níquel
Hierro	Plomo
Magnesio	Aluminio
Cobre	Cadmio
Cobalto	Arsénico
Cromo	

El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad, con peso atómico elevado y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas (Rodriguez & Garcia, 2006).

En la actualidad, 14 millones de productos químicos relacionados con estos elementos se encuentran en el medio ambiente y son tóxicos más allá del nivel de umbral (Kristen, 1997; Ohe, 2004; Leme & Marin, 2009). Este número va en aumento y constituye una amenaza gradual para el sector acuático. Por ello la exigencia de controlar esas emisiones al medio ambiente para el aseguramiento de la calidad del mismo (Iqbal, 2016). Además, algunos metales ingresan habitualmente a diversos organismos en porciones menores, por diferentes fuentes

de exposición, con capacidad de persistencia y bioacumulándose en ellos durante largo tiempo.

Numerosos estudios recientes demuestran que la **bioacumulación de los metales es debido a exposiciones** crónicas y con potencial de toxicidad para varias formas de vida. Debido a esta característica, muchas de esas sustancias se transforman en agentes genotóxicos y mutagénicos que son aún más problemáticos debido a que pueden causar trastornos hereditarios (Economou et al., 2014). Por todo lo anterior es importante entender el impacto potencial de los efectos que los metales presentan sobre el ambiente (Palacios et al., 2003).

Los principales metales pesados clasificados como contaminantes ambientales son: el cadmio, mercurio, plomo y **cromo** (Schinitman, 2004).

2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES, PRODUCCIÓN Y USOS DEL CROMO

El cromo (Cr) ocupa el vigésimo primer lugar en abundancia sobre la tierra (alrededor del 122 ppm) y es el sexto elemento más abundante en la corteza terrestre teniendo una concentración promedio de 1000 µg/g (Stoeppler, 1992). Este metal no se encuentra de forma libre en la naturaleza debido a su gran reactividad, por lo que se extrae a partir de un producto mineral primario combinado con hierro y oxígeno denominado *cromita* (FeCr_2O_4) siendo ésta su forma más abundante. El elemento se descubrió en 1797, su nombre proviene del griego “*chromos*” que significa color y se debe a las tonalidades tan intensas de sus compuestos derivados. Se recupera fundamentalmente en sales de cromatos y dicromatos, además de óxidos de aluminio (Sepúlveda et al., 2005). Está presente de manera natural mineral en rocas, plantas, suelos, animales, humos y gases volcánicos (Gilling & Pérez, 2001). Puede encontrarse en diversos estados de oxidación que van desde Cr^{+2} hasta Cr^{+6} , siendo los estados Cr^{+3} y Cr^{+6} los más estables y de mayor interés, mientras que las valencias +2, +4 y +5 también existen en el entorno temporalmente alcanzando una rápida estabilización a los estados más estables a través de reacciones de óxido-reducción (Bartlett, 1991).

El cromo y sus compuestos tienen una gran diversidad de aplicaciones dentro de los cuales se pueden encontrar la galvanotecnia para cromar otros metales, actuando como inhibidor de corrosión, en industria automotriz, convertidores catalíticos, adornos cromados y para el control de otros sistemas de decoración. Existen superaleaciones con resistencia a altas temperaturas del Cr en tecnología aeroespacial (Nriagu, 1988). En la fabricación de colorantes y pigmentos, en el curtido de pieles y en la industria de la cerámica. Además, es utilizado en la manufactura de productos pirotécnicos y explosivos (ej. la elaboración de cerillos de seguridad). Pero también se puede encontrar en algunos componentes de equipos eléctricos, como piezas recubiertas de cinc, placas de circuitos, tubos de rayos catódicos y baterías eléctricas. En productos para impresión, material fotográfico y la conservación de la madera. En la fabricación de telas repelentes al agua. Asimismo es usado como reactivo analítico en la síntesis de productos químicos orgánicos (Pineros & Quintero, 2008).

2.4 DICROMATO DE POTASIO: Sustancia de ensayo

2.4.1 Descripción y características generales:

El dicromato de potasio se puede apreciar físicamente como un sólido cristalino de color intenso naranja-rojizo, soluble en agua. Es altamente comburente, por lo que al entrar en contacto con sustancias orgánicas puede provocar incendios. A diferencia del dicromato de sodio, este no es higroscópico, actúa como un agente oxidante en las reacciones de óxido-reducción en las cuales se da un intercambio de electrones. Sus cristales tienen formas triclinicas con simetría pinacoidal y sin olor (UNAM, 2007).



Ilustración 2. Dicromato de Potasio (Silva, 2011)

2.4.2 Estructura y propiedades fisicoquímicas:

En la ilustración 3 se presenta la estructura química del dicromato de potasio y en la tabla 2 se pueden apreciar sus características físicas y químicas.

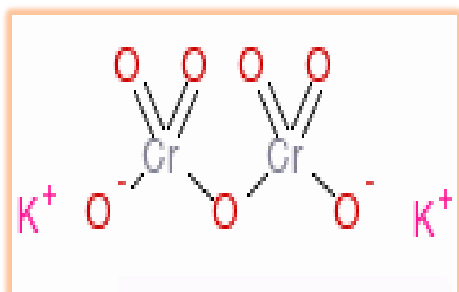


Ilustración 3. Estructura química del dicromato de potasio. (Silva, 2011)

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del dicromato de potasio (UNAM, 2007)

Propiedades físico-químicas del dicromato de potasio
Formula: $K_2Cr_2O_7$
Peso molecular: 294.21 g/mol.
Punto de Ebullición: 500 °C
Punto de fusión: 398 °C
Densidad (a 25 °C respecto al agua a 4 °C): 2.676
Solubilidad: soluble en agua (120 g/L en agua a 20°C)
Una disolución acuosa al 1% tiene un pH de 4.04 y una al 10 % de 3.57.

2.4.3 Síntesis:

Al tratarse de una sustancia de origen artificial se obtiene a partir de la síntesis química por medio de dos reacciones y cada una emplea reactivos distintos:

La primera por intercambio del catión a partir de cloruro de potasio y dicromato de sodio: $Na_2Cr_2O_7 + 2 KCl \rightarrow 2 NaCl + K_2Cr_2O_7$

También se obtiene a partir del cromato potásico o cromito acidulando con ácido sulfúrico: $2K_2CrO_4 + H_2SO_4 \rightarrow K_2SO_4 + K_2Cr_2O_7 + H_2O$

2.5 INCORPORACIÓN DEL CROMO EN EL MEDIO AMBIENTE

El cromo ingresa al ambiente acuático y de los suelos por medio de dos fuentes: 1) Origen Natural y 2) Origen antropogénico (actividades humanas). Como se ha mencionado, este es un metal importante en la industria y es utilizado en diferentes productos y procesos. En muchos sitios de disposición de residuos o plantas industriales este metal se libera al ambiente por filtración debido a las prácticas

inadecuadas de disposición desechos o a las medidas deficientes de almacenamiento en la manufactura de productos.

El cromo se encuentra, relativamente como Cr (III) en las fases sólidas, y se libera al el medio acuático en cantidades limitadas por acciones climáticas y de erosión.

Las emisiones atmosféricas de cromo a partir de fuentes naturales vienen derivadas del elemento en suspensión (Nriagu, 1990). La erosión de los suelos es una fuente natural importante de cromo. Aunque la mayoría del metal liberado de Cr (III) y Cr (VI) es debido a los desechos de las distintas actividades industriales que son descargados directamente en el medio ambiente acuático. Incluso, se estima que varios países desarrollados entre ellos Canadá liberan aproximadamente 24 toneladas anualmente de vertidos con la presencia de este metal proveniente de refinerías, fundidoras, etc. (MacLatchy, 1992; Albert, 2006; Rangel & Maldonado, 2014).

De ellas, aproximadamente un 54% son atribuibles a la combustión de elementos fósiles, un 29% para diversos procesos industriales y un 12% debido a la combustión interna. Otras fuentes de contaminación por Cr provienen del desgaste de neumáticos, en convertidores catalíticos automotrices, o la liberación de polvo cromado utilizado en los *toners* de fotocopadoras (ATSDR, 1988; Pereira, 2013).

Otras fuentes potencialmente significativas de esta sustancia en el medio acuático incluyen las descargas de las industrias de curtido de cuero, escurrientías de aguas pluviales, a partir de efluentes las plantas de celulosa y papel, o los vertidos de instalaciones térmicas. Sin embargo el proceso de curtido es uno de los mayores contaminantes de cromo en todo el mundo (Albert, 2006). Ya que el cuero ocupa sólo el 60-80% de cromo aplicado, y el resto por lo general se descarga en el sistema de aguas residuales que causan impacto ambiental grave (Velandia, 2010).

Siendo la forma hexavalente 500 veces más tóxica que el trivalente (Fahima et al., 2006), y de ahí que **el cromo hexavalente sea el de mayor importancia toxicológica** (Gilling & Pérez, 2001).

Un estudio realizado por Webber & Shameess (1987), menciona que el contenido de cromo presente en los residuos domésticos de países europeos que entra en las aguas residuales municipales cada año se retiran restos de este elemento unido al lodo, con el consiguiente peligro de ser éste utilizado para prácticas agrícolas.

Finalmente, la manipulación y almacenamiento de productos químicos a base de Cr (VI) para conservación de la madera se incrementó de manera alarmante en el año de 1995, incluyéndolos como componentes principales en sus formulaciones (Bamwoya et al., 1991). Asimismo, el desgaste de la madera tratada expuesta a la lluvia ácida también puede liberar este metal a los suelos y contribuir siendo una fuente más de contaminación a los mantos freáticos.

2.6 DESTINO MEDIOAMBIENTAL DEL CROMO

El destino de cromo vertido en el medio ambiente puede variar dependiendo de su forma química (Murray et al., 1983; Campbell, et al., 1997).

Como se mencionó anteriormente, el cromo trivalente tiende a estar asociado con fases sólidas relativamente inertes, y por lo tanto puede acumularse y persistir en sedimentos y suelos, pero la disponibilidad para su absorción por la biota puede ser limitada. Los resultados de estudios recientes indican que el Cr (III) puede ser oxidado fotoquímicamente a Cr (VI) en aguas superficiales aeróbicas. La mayoría de las formas de Cr (VI) son muy solubles y aun que no son fácilmente adsorbidas en la materia particulada, tienen gran movilidad en aguas y suelos (Pereira, 2013).

En cambio el Cr (III) forma óxidos altamente insolubles, hidróxidos y fosfatos, y es adsorbido por las partículas en suspensión. En disolución se elimina rápidamente de la superficie de las aguas por sedimentación de las partículas (Cranston & Murray, 1993). Existen oxidantes producidos por algas (ej. H_2O_2) en aguas superficiales capaces de convertir Cr (III) a Cr (VI) a diferentes velocidades de reacción (Pettine & Millero, 1990). Aunque también, puede formar complejos estables con muchos ligandos disueltos o en forma coloidal, orgánicos e inorgánicos, y por lo tanto pueden permanecer en la columna de agua (Masscheleyn et al., 1992). Del mismo modo, en los sedimentos, el Cr (III) se oxida a Cr (VI) por

la acción de óxidos (ej. MgO) presentes en la interfase agua-sedimento (Saleh et al., 1989). Este proceso de oxidación genera la lixiviación ácida y/o liberación del Cr en el ecosistema acuático (Bartlett & James, 1988).

En procesos de adsorción del Cr (VI), se realiza a través de suelos neutros a ligeramente ácidos, especialmente aquellos que contienen cantidades grandes de óxidos de hierro (Rai et al., 1993). De la misma forma, puede reducirse a Cr (III) por reacciones de reducción o con el aumento del pH del suelo, dando lugar a la remoción de Cr (VI) adsorbido.

En contraste con los autores Rai et al. (1993), señalan que la forma hexavalente no es fácilmente absorbida en aguas de superficie, aunque la mayoría de sus sales son solubles. A su vez, el Cr (VI) se reduce a Cr (III) por acción de agentes reductores naturales tales como como el S^{2-} , Fe (II), ácido fúlvico, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y por proteínas, por lo que es removido de la solución, sobre todo en aguas más profundas anaeróbicas (Melo, 2006). La efectividad de estos agentes reductores varía con el pH, condiciones redox, y las concentraciones de cromo total (Pereira, 2013).

Una pequeña cantidad de Cr (VI) puede ser absorbido por el plancton y lanzado como Cr (III) a mayores profundidades, donde el oxígeno está muy reducido (Brady et al., 1994). En la mayoría de los organismos, el Cr (VI) se reduce a Cr (III), forma que comúnmente es encontrada en proteínas, enzimas y nucleótidos (Nieboer & Jusys, 1988).

En general, el Cr (VI) se absorbe a nivel celular más fácilmente que el Cr (III) (Lou et al., 2010). Por lo que este metal es fácilmente acumulado por la biota acuática (Oze et al., 1974; Jackson, 1988), aplicando factores de corrección entre 100 y 1000 para expresar el riesgo de bioconcentración. Sin embargo, el cromo no sufre un fenómeno de biomagnificación en las cadenas tróficas, ya sean acuáticas o terrestres (Mance 1987; Outridge & Scheuhammer, 1993). Aunque esto ha sido causa de estudios recientes que demuestran lo contrario (Marchese et al., 2008).

2.7 IMPACTO DEL CROMO EN EL MEDIO ACUÁTICO

De manera general el cromo, a altas concentraciones, se comporta como tóxico, mutagénico, teratógeno y carcinogénico. El cromo hexavalente es mucho más tóxico para la mayoría de las plantas, animales y bacterias que habitan entornos acuáticos. Muchos de los microorganismos son sensibles a sus efectos tóxicos, pero algunos grupos poseen mecanismos de resistencia para tolerar altos niveles de este elemento. Como se ha mencionado debido a su alta solubilidad, actúa como un fuerte agente oxidante que causa graves daños a las membranas celulares debido a su capacidad para formar complejos con ácidos nucleicos, proteínas, y compuestos orgánicos. En concentraciones arriba de 0.5 ppm (5mg/L) afecta seriamente el crecimiento y reproducción de peces y algunas especies de algas (Marchese et al., 2008).

Sin embargo, la reciente detección de niveles tóxicos significativos de Cr (VI) en aguas superficiales y subterráneas en diferentes partes del mundo plantean cuestiones críticas relacionadas con la disposición actual de los residuos que contienen este metal. Este factor es de interés ecológico, porque a un pH bajo, el Cr (VI) es biodisponible, siendo esta forma muy móvil y por lo tanto, representa el mayor riesgo de contaminación de las aguas (Avudainayagam et al., 2003).

En una investigación realizada por Kisku et al. (2000), indicaron que el efecto tóxico de este elemento puede ser variable, dependiendo de las especies involucradas, (ej. se indica que el ion dicromato es más tóxico que el cromato), lo cual se atribuye a que la primera especie existe en medio ácido que favorece su capacidad oxidante ya que forma especies solubles a lo largo de todo el intervalo de pH, que interactúan con el material biológico, aun en niveles bajos de concentración, éste se difunde en los tejidos de cualquier organismo, y aunque haya una reducción a Cr (III) se provoca acumulación, que simultáneamente, puede coordinarse a moléculas biológicas ocasionando que estas dejan de funcionar en forma normal. Estos resultados hicieron que algunos investigadores estudiaran el fenómeno acumulativo del cromo en la cadena trófica, y así, fue como Marchese et al. (2008) analizaron cuatro especies abarcando desde plantas, almejas, cangrejos

y peces, encontrando niveles preocupantes de cromo y afirmando su alto potencial de acumulación. Esto indica claramente un problema, no solo para los primeros niveles tróficos si no también, para los seres humanos, que se encuentran en la parte superior de la cadena alimentaria (Shrivastava et al., 2002).

2.8 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL CROMO

En el estudio de los efectos del cromo, se consideran aspectos químicos y de interacción molecular, a partir de su obtención, transformación y aplicación industrial que conllevan aspectos negativos sobre la salud de los seres vivos, sobre todo porque químicamente sus compuestos altamente oxidantes afectan células y tejidos. Estas interacciones dependen del estado de valencia, naturaleza de enlaces químicos y vía de exposición (Services, 2012). En ese entorno se irá describiendo la toxicidad que tiene este metal como producto de su interacción con organismos vivos.

Shivatava, (2002) y Katz & Salem,(1993) señalaron que, los compuestos de Cr (III) son relativamente inocuos debido a que son insolubles y no pueden atravesar las membranas biológicas, aunque en altas concentraciones y dependiendo de la presencia de ciertas sustancias en el medio acuático, pueden presentar los mismos efectos tóxicos que los de Cr (VI). No obstante, el Cr (III) funciona como un oligoelemento esencial en los seres humanos, ya que ayuda a promover la acción de la insulina en los tejidos, para aprovechar azúcares, grasas y proteínas. En contraste con el Cr (VI) considerado la forma más tóxica del metal, debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato (Borst, 1981).

Wetterhahn (1983) es uno de los primeros en proponer el modelo de absorción-reducción como el posible mecanismo de acción mediante el cual se explica el problema de carcinogénesis relacionada con el Cr (VI). En dicho estudio estos investigadores concluyeron que los efectos carcinogénicos se encontraban directamente relacionados con el dicromato, que es el principal compuesto que forma el Cr (VI) el cual, por tener la ventaja de un tamaño y simetría similar a la de

los aniones sulfato y fosfato, presenta la habilidad para cruzar la membrana celular por medio de canales aniónicos no específicos de transporte. Una vez dentro, en el citoplasma al entrar en contacto con sustancias reductoras, tales como ascorbato, glutatión, cisteína o dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), los aniones dicromato son sometidos a una serie de procesos reductores con la consecuente formación de Cr (V) y Cr (VI), que a su vez provocan la generación de varios radicales libres constituyendo agentes potenciales de daño directo a la estructura del ADN celular, que ocasionan la ruptura de enlaces de ADN, aberraciones cromosómicas, aumento en el intercambio de cromátidas hermanas, síntesis espontánea de ADN, causando así severas afectaciones en el ADN y proteínas (Cruz, 2009).

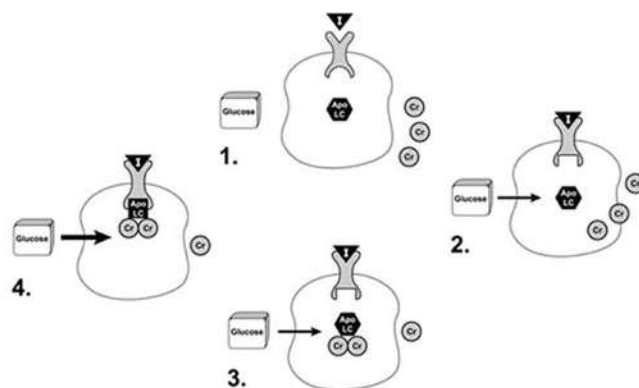
Además de lo anterior, Valko et al. (2006) mencionan que es determinante el papel que juega el Cr (VI) como mediador en el proceso de formación de radicales libres, que inducen la formación de fenotipos celulares oncogénicos. Por lo que ha propuesto que la toxicidad se debe a que dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo que en presencia de H_2O_2 funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, generando Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), con el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Ercal et al., 2001; Liu & Shi, 2001). Las ERO incluyen el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH^\cdot$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno molecular (O_2) que tiene una configuración única y es considerado por sí mismo un radical libre y la principal ERO porque reacciona con un mayor número de moléculas para formar otras ERO secundarias en donde participa directa o indirectamente en reacciones catalizadas por metales de transición, ya que puede ocurrir la adición de un electrón al oxígeno molecular forma el radical superóxido (Miller et al., 1990; Valko et al. 2005).

Por otra parte Wise, et al. (2000) mencionaron que, en relación con los mecanismos de acción mediante los cuales el Cr (VI) llega a inducir cáncer, reconocen como una posibilidad, la inestabilidad cromosómica que éste genera, particularmente, induciendo fenotipos tetraploides. Asimismo, indican que el Cr (VI)

puede inducir la formación de tumores en aquellos sitios, donde se impactan y persisten sus partículas. Estos investigadores también encontraron que dependiendo de la concentración así como el tiempo de exposición, será el nivel del número de células tetraploides (alteradas), mismas que seguirán desarrollándose hasta formar las masas tumorales. Precizando además que, cuando las células son sometidas repetidamente a concentraciones de exposición crónica al Cr (VI) soluble, aparece un incremento importante tanto en el número de procesos mitóticos aberrantes, es decir el efecto carcinogénico está relacionado con alteración del ADN intracelular, de manera que primero se provocan lesiones que modifican la conformación de las bases de guanina, afectando la replicación del ADN aumentando el riesgo de mutaciones.

2.9 EFECTOS TÓXICOS GENERALES DEL CROMO SOBRE LA SALUD HUMANA

Como se ha mencionado el Cr (III) es un elemento esencial que es requerido tanto en plantas como animales, ya que tiene una función preponderante en el metabolismo de la insulina como factor de tolerancia a la glucosa (FTG). Su déficit genera un deterioro del metabolismo de la glucosa por la mala eficiencia de la insulina (Figura 4) (Alvarado, et al., 2002). Dichos requerimientos diarios varían de 50 a 200 µg.



1. La insulina se une a su receptor y lo activa.
2. La activación del receptor de insulina estimula la entrada de cromo a la célula.
3. El cromo se une a un péptido conocido como Apo-LMWCr* (Apo-LC).
4. El péptido LMWCr (LC) funcional se une al receptor de insulina y aumenta su actividad.

*LMWCr = Sustancia de unión a cromo de bajo peso molecular (Low-molecular weight chromium-binding substance)

Ilustración 4. Mecanismo de acción del cromo sobre la actividad de la insulina (Vincent, 2000)

Los efectos potenciales de este metal sobre la salud humana dependen de una diversidad de factores, tales como la forma química en que se presente, la cantidad, el tiempo y la forma de exposición (ingestión, inhalación o absorción a través de la piel). Las reacciones y la gravedad de sus efectos dependen en gran medida de otros factores adicionales que también son determinantes tales como la edad, el sexo, el peso corporal y el estado de salud del individuo (Gutiérrez & Miranda, 1994). Se sabe que el cromo hexavalente es mucho más tóxico por inhalación que por ingestión (Costa & Klein, 2006). Otros problemas de salud que son causados por el Cr (VI) son: 1. Erupciones cutáneas, 2. Malestar de estómago y úlceras, 3. Problemas respiratorios con efectos leves de irritación en mucosas, hasta afecciones más severas como: dolor nasal, perforaciones y ulceración del tabique nasal etc. Además de daño en los riñones e hígado, como consecuencia a exposiciones prologadas.

2.10 LEGISLACIÓN

La liberación de Cr (VI) por su uso en actividades industriales y manejo inadecuado de los residuos generados, además de los efectos adversos al medio ambiente y a la salud demostrados por agencias ambientales, han dado lugar a su clasificación a nivel internacional como contaminante crítico. Esta sustancia oxidante se encuentra en las listas nacionales e internacionales de materiales de alta toxicidad a los que se aplican rigurosos procedimientos de control. Sólo en Estados Unidos, el Cr VI está regulado como sustancia peligrosa, siendo un metal tóxico en aire, suelo y agua según la ley sobre contaminación acuática (EPA, 2015). Por lo que el límite máximo permisible de cromo contenido en descargas de aguas residuales es de 0.5 mg/L de acuerdo con la EPA, (2004) y ESHO, (2008). En el caso de afectaciones humanas, la FDA (2015) indica que la concentración de cromo en el agua embotellada para consumo humano no deberá exceder 0.1 mg/L.

En relación a la normatividad de nuestro país, hemos encontrado algunos datos relevantes:

1.- Son muchas las empresas oficialmente registradas que se dedican al uso y explotación del cromo (Tabla 3) por lo que, en términos de seguridad y salud, los

compuestos de Cr^{+6} deben ser regulados con mayor exigencia en función de la concentración, características de la actividad y tiempo de exposición, así como condiciones de manejo especiales (NOM-001-ECOL-1996).

Tabla 3. Industrias en México destinadas al uso y explotación del cromo y sus derivados (Rangel & Maldonado, 2014).

Industria	Compuestos comúnmente utilizados	Número de empresas en México
Fabricación de pigmentos y pinturas	Cromato de plomo (amarillo, cromo verde, naranja de molibdeno), cromato de zinc, cromato de bario, cromato de calcio, dicromato de potasio, cromato de sodio	339
Cromadoras	Trióxido de cromo (ácido crómico), cromato de zinc, cromato de bario, cromato de calcio, dicromato de calcio y cromato de estroncio	612
Soldadoras de acero inoxidable	Se generan vapores de Cr (VI) cuando el acero es fundido, soldado o cortado con plasma.	ND
Fabricación de cemento y productos de concreto	Derivado de impurezas dentro de su fabricación	5,944
Fabricación de Pigmentos textiles	Dicromato de amonio, cromato de potasio, cromato de sodio	62
Tratamiento de la Madera	Trióxido de cromo	12
Curtido y acabado de piel	Dicromato de amonio	945
Minería de cobre, plomo y zinc	Dicromato de sodio	34
Totales		7,336

2.- México junto con otros países como Canadá, Estados Unidos, y China son naciones que permiten cantidades mínimas de emisiones de cromo hexavalente en aguas; en contraste con Polonia, cuyo país es más flexible en cuanto a la cantidad de emisiones en agua por cromo.

Tabla 4. Límites máximos permisibles de exposición de Cr ⁺⁶ en diversos países (Department of Health and Human Services, 2013).

Compuestos que originan Cr ⁺⁶ en agua (µg/m ³)		
País	Insolubles	Solubles
Japón	10	10
Suiza	20	20
Holanda	10	25
Canadá, China, México, EUA	10	50
Australia, Reino Unido, Irlanda	50	50
Polonia	100	100

Continuando específicamente en nuestro país, la presencia de cromo hexavalente en suelos es regulada por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 la cual considera como límite 280 mg/kg en suelos agrícolas y de 510 mg/kg para suelos de uso industrial.

Por otra parte en lo que respecta a aguas residuales, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, *considera al cromo como uno de los metales que en concentraciones por encima de determinados límites, puede producir efectos en la salud humana, flora y fauna.* Los límites máximos permisibles para el cromo se resaltan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Límites máximos permisibles para cromo total en cuerpos de aguas mexicanas.

Límites máximos permisibles para cromo total (mg/L)															
Ríos						Aguas Costeras						Suelos			
Uso en riego agrícola (A)	Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)			Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)	Recreación (B)		Estuarios (B)			Uso en riego agrícola (A)	Humedales Naturales (B)		
P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D
1.0	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0

P.D = Promedio Diario.

P.M = Promedio Mensual.

(A), (B) y (C): Tipo de cuerpo receptor según la Ley Federal de derechos.

2.11 LA INVESTIGACIÓN ECOTOXICOLÓGICA: BIOENSAYOS COMO HERRAMIENTA

Los ecosistemas acuáticos son los ambientes que más están siendo afectados al ir incrementándose drásticamente su contaminación, debido a que son utilizados como vertederos de todas las descargas de desechos industriales y residuos resultantes de un sin número de actividades antropogénicas.

La gravedad de esos efectos dependerá de diferentes causas, como la naturaleza química del contaminante, sus propiedades fisicoquímicas, que incluyen el carácter reactivo de dicha sustancia, su concentración, biodisponibilidad, y su persistencia debida a la frecuencia de sus emisiones (Beg, et al., 2001; Cortez, 2012).

Por esa razón, es necesario cuantificar el daño causado empleando técnicas adecuadas y precisas que permitan evaluar las condiciones en las que se encuentran.

Actualmente se puede hacer uso de herramientas que se aplican en la ecotoxicología, mediante mediciones experimentales que en algunos casos nos

permiten descubrir concentraciones muy bajas de contaminantes que son potencialmente tóxicas. Esta investigación se basa principalmente en dos tipos de monitoreo: ambiental y biológico (Chapman, 2000).

El monitoreo ambiental, establece las formas mediante las cuales se liberan los compuestos y su destino en el medio ambiente, detectando y cuantificando la presencia de contaminantes en diferentes compartimentos (aire, agua, suelo y sedimentos).

Y el monitoreo biológico evalúa los efectos de los contaminantes sobre individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas, mediante pruebas de laboratorio o estudios de campo.

En las pruebas de laboratorio, se administra un compuesto a una especie particular en condiciones controladas. Presenta la ventaja de simplificar el sistema, y ser capaz de establecer mejor los efectos atribuibles a una sustancia, pero no tiene en cuenta la interacción con otros organismos y compuestos, así como con factores ambientales, lo que dificulta la extrapolación. Suele realizarse sobre fracciones subcelulares, cultivos celulares, tejidos u organismos aislados para medir efectos sobre la viabilidad o la reproducción celular (Chapman, 2000).

Los estudios de campo sin embargo evalúan los impactos de los contaminantes sobre los organismos que representan distintos niveles tróficos, bajo las condiciones reales. Considerando por tanto el efecto de todas las sustancias presentes y sus interacciones (adición, sinergia o antagonismo) y los efectos sobre factores climáticos (temperatura, pH, humedad, salinidad, radiación, etc.). Estos estudios miden variaciones que se salen de la normalidad, además evalúan situaciones como reducción de la productividad, reducción de la generación de biomasa, disminución del número y la distribución de especies, cambios en la estructura trófica (Chapman, 2002).

Estas herramientas que emplea el monitoreo biológico por medio de pruebas de laboratorio son los *bioensayos*, básicamente consisten en la exposición de

diferentes grupos y cantidades de organismos a determinadas concentraciones de un tóxico por cierto periodo de tiempo (Velandia & Motañez, 2010).

Por lo tanto, los bioensayos también llamados *pruebas de toxicidad* son consideradas de gran utilidad ya que nos ayudan a lograr un diagnóstico adecuado para determinar el efecto y evaluar la toxicidad química de los desechos industriales que afecten la vida de diferentes grupos de seres vivos (Ortuño, et al., 2009).

Estas pruebas permiten calcular efectos que pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos, también inmovilidad, alteraciones de comportamiento, etc. Lo que permite realizar mediante un análisis estadístico la determinación de la denominada **concentración letal media (CL₅₀ o LC₅₀ en inglés)**, que es la concentración letal para el 50% de los organismos expuestos, cuando menor sea este valor, más elevada será la toxicidad de dicha sustancia y de esa manera se puede establecer la peligrosidad de cualquier tóxico al ser vertido al ambiente acuático (Ortuño, et al., 2009; Cortez, 2012).

Además los bioensayos tienen la ventaja de poder identificar los efectos sinérgicos y antagónicos causados sobre organismos representativos de aguas receptoras imposibles de ser detectados por los métodos analíticos convencionales (Iannacone, et al., 1998; Alayo & Iannacone, 2002). Estos ensayos han sido recomendados por la Environmental Protection Agency (EPA) como un complemento ideal de las técnicas analíticas empleadas en la evaluación ambiental. En los bioensayos son comúnmente usados miembros de la red trófica acuática, como peces, artrópodos (Idoniboye, 1997) y microalgas (Iannacone & Gutiérrez, 1999).

Los resultados del bioensayo establecen concentraciones seguras que permitirán mantener protegido a todo el ecosistema, pero se debe de considerar que diferentes especies muestran distinta sensibilidad a diferentes contaminantes (Diaz & Bustos, 2004; Cortez, 2012).

Para que los bioensayos se puedan elegir y aplicar de manera adecuada deben de reunir las siguientes características de acuerdo a los autores Ramírez & Mendoza (2008), la información se muestra a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 6. *Criterios para la selección de bioensayos en el laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas (Ramírez & Mendoza, 2008).*

Factibilidad de la prueba	✓ Bajo costo. ✓ Materiales y reactivos disponibles en la zona. ✓ Tiempo máximo de desarrollo, 5 días. ✓ Procedimiento de prueba simple. ✓ Facilidad en la evaluación de la respuesta a medir.
	✓ Condiciones presentes en el ecosistema de la zona a evaluar (salinidad, temperatura, dureza etc.). ✓ Concentraciones químicas reales que se presenten en el ecosistema. ✓ Técnicamente seguros y no contaminantes. ✓ Posibilidad de ser estandarizados. ✓ Buena precisión y exactitud analíticas. ✓ Aplicación universal (usos, ventajas y limitaciones). ✓ Significado ecológico de los resultados.

Cabe destacar que el potencial nocivo de cualquier sustancia tóxica puede ser contrarrestado por el sistema biológico de cualquier ser vivo a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos etc. Por lo tanto la toxicidad aparente evaluada mediante un bioensayo es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico del ser vivo estudiado (Castillo, 2004).

2.12 BIOINDICADORES

Como se ha referido en el apartado anterior para llevar acabo los ensayos de toxicidad y evaluar los efectos tóxicos de las sustancias contaminantes, se efectúan dichas pruebas bajo la exposición controlada de organismos que han sido previamente seleccionados y que además son representativos de las zonas de

estudio (Dorn, et al., 1987; Chapman, 2000; Cortez, 2012). Dichos organismos son llamados *bioindicadores* o *indicadores toxicológicos*, estos poseen requerimientos particulares con relación a uno o a un conjunto de variables físicas o químicas, tal que los cambios de presencia/ausencia, número, morfología o de conducta de esa especie en particular, indiquen que las variables físico-químicas consideradas, se encuentran cerca de sus límites de tolerancia (Rosemberg & Resh, 1993) y mientras más estrechos sean estos límites mayor será su utilidad como indicador biológico (Cortez, 2012). Es decir, que un bioindicador es aquel cuyas respuestas biológicas son observadas frente a una perturbación ecológica y están referidos como organismos o sistemas biológicos que sirven para evaluar variaciones en la calidad ambiental (Gamboa, et al., 2008).

Es relevante mencionar que no existe ningún organismo o biocenosis que pueda ser usado para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo condiciones abióticas y bióticas presentes. En la práctica solamente unas pocas especies (especies modelos), que representen funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas (Ortuño, et al., 2009).

De manera general, las características ideales que deben poseer son las siguientes: ser especies importantes desde el punto de vista recreacional, económicas y ecológicas; específicos, abundantes, de gran sensibilidad, fáciles y rápidos de identificar, con ciclo de vida corto y con un amplio conocimiento sobre su biología que permita su manejo en el laboratorio.

En este caso un conocimiento detallado de los organismos a nivel individual es fundamental, es decir, a nivel de *género* y *especie* si se quiere que su diagnóstico sea lo más exacto posible (Roldan, 1999). De tal forma que permitan la comparación antes y posteriormente de una alteración en su ambiente.

A nivel mundial tenemos gran biodiversidad de ecosistemas naturales, complejos, multivariados y, simultáneamente están expuestos a una gran pluralidad de estresores con efectos acumulativos, por lo que existe la propuesta de usar diferentes grupos de organismos como bioindicadores que sean capaces de medir

y cuantificar la magnitud del estrés del hábitat y del grado de la respuesta ecológica a la que están siendo sometidos. Y su empleo sobre ecosistemas acuáticos en diversos países no solo está enfocado a medir la salud de dicho ecosistema, si no también valora el impacto potencial al ámbito humano (De la Lanza, et al., 2000).

Sin embargo, otras opciones de prueba enfrentan varias dificultades; la principal de ellas es la carencia de información biológica que permita comprender los mecanismos de reacción para interpretar de forma apropiada las respuestas de intoxicación, que por consecuencia dificulta la obtención de lotes confiables de individuos para ser usados en ensayos, también falta de coherencia y solidez en los resultados y déficit de conocimiento de los intervalos normales de respuesta a fin de determinar cuándo se expresa un resultado verídico significativo (Arenzon, et al., 2003). Por lo anterior surge la necesidad de buscar y proponer especies alternas debidamente estudiadas, que proporcionen la información adecuada, comprensible y con facilidad de poder extrapolar acorde a las condiciones ambientales acuáticas de diferentes zonas geográficas mundiales (Kwok, et al., 2007).

Hay diferentes grupos de organismos bioindicadores, pero constantemente se recurre a especies que pertenecen a las comunidades planctónicas de sistemas acuáticos ya que estas están constituidas por organismos con periodos de vida cortos y muchos de ellos son fácilmente manipulables. Ello ha permitido que la formulación, a partir de hipótesis experimentales basadas en interacciones biológicas y/o físicas, de modelos sobre la estructura de comunidades acuáticas sea más fácil que en los sistemas terrestres.

El zooplancton acuático está compuesto por animales con altas tasas de crecimiento, un rasgo que permite responder rápidamente a ambientes cambiantes. Otra de sus características es su capacidad para producir abundantes huevos de resistencia que mantienen su viabilidad durante décadas o siglos (Hairston, 1996). Por lo que el conocimiento sobre la toxicidad que puedan ejercer diferentes sustancias a las especies pertenecientes a este grupo, permite predecir algunas de las alteraciones en consumidores de niveles tróficos superiores (peces, pájaros y varios invertebrados e incluso en mamíferos) (Conde, et al., 2004).

Uno de los organismos pertenecientes al primer nivel de la cadena trófica (zooplancton) son las especies del género *Artemia* ampliamente usadas como modelo bioindicador (Crespo, 1999; Mechaly, et al., 2004).

2.13 CICLO DE VIDA DEL GÉNERO ARTEMIA

Este género responde a un crustáceo branquiópodo, anostraceo (Tabla 7), también son llamados "monos de mar" o "brine shrimp" en inglés. Se caracterizan por apéndices torácicos en forma de hoja (toracopodos), cada uno de los cuales portador de una branquia, y por la ausencia de caparazón rígido contrariamente a lo que suele ser común en la mayoría de los crustáceos. Su cuerpo es blando, de color café-marrón claro por presentar beta-carotenos, aunque a la luz son transparentes (Castello, 1993).

Tabla 7. Clasificación taxonómica del genero Artemia (Rivera, 2013).

Phyllum	Artropoda
Clase	Crustacea
Subclase	Branquiopoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae, Grochowski, 1895
Genero	Artemia Leach 1819

Su anatomía se divide en tres regiones principales: cabeza, tórax y abdomen (Ilustración 5). En la primera región se destacan un par de antenas no articuladas con actividad quimio-sensorial, dotadas de un comportamiento variable frente a la luz, el cual se vincula a las necesidades de los primeros estadios larvarios, probablemente en busca de temperaturas favorables y alimento que faciliten su desarrollo en aguas superficiales (Valiela, 1995).

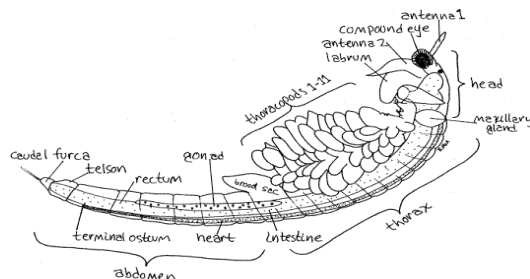


Ilustración 5. Característica anatómicas de *Artemia* (Rivera, 2013)

Estos microorganismos son de distribución cosmopolita y están representados en todo el mundo por siete especies con distinto tipo de reproducción: sexual y partenogénesis (Sorgeloos, et al., 1986; FAO, 2015) (Tabla 8). Su origen puede ser natural o por inoculación artificial de quistes, siendo el principal mecanismo de distribución y colonización de nuevos hábitats el transporte de quistes por aves migratorias y el viento; aunque el hombre ha contribuido a la dispersión introduciendo estos individuos en regiones fuera de su de entorno natural (Vanhaecke & Sorgeloos, 1980; De los Rios & Zuñiga, 2000).

Tabla 8. Especies que conforman el género *Artemia* (Abreu-Grobois & Beardmore, 1980; FAO, 2015).

Tipo de reproducción	Especie	Localización
Sexual	<i>Artemia franciscana</i>	Norte, Centro y Sur América
	<i>Artemia persimilis</i>	Argentina
	<i>Artemia monica</i>	lago Mono, California, Estados Unidos de América
	<i>Artemia salina</i>	Lyntong Inglaterra y área Mediterránea.
	<i>Artemia tusiana</i>	Europa
	<i>Artemia urmania.</i>	Lago Urmia, República Islámica de Irán y un sitio de Crimea, Ucrania
Partenogenica	<i>Artemia partenogenica</i>	Europa y Asia.

Artemia franciscana, es una especie originaria de América, vive principalmente en zonas tropicales y subtropicales cálidas (Triantaphyllidis & Sorgeloos 1998; De los Rios, 2001). México se encuentra dominado por esta especie. Los trabajos realizados con poblaciones de artemias mexicanas versan sobre características biométricas y reproductivas, siendo pocos los estudios toxicológicos (Castro, et al., 2010). Los autores Triantaphyllidis, et al. (1995) y Barata, et al. (1996) señalan que se prefiere cultivar *A. franciscana*, ya que ésta resiste mejor factores abióticos, en comparación a las especies partenogenicas, lo que ha sido demostrado principalmente al observarse valores de sobrevivencia y fecundidad significativamente altos. Además presenta mejor éxito colonizador si se introduce en nuevos hábitats, desplazando a la fauna nativa según Williams & Geddes (1991).

La hipersalinidad severa y cambios en la temperatura de estos lugares imponen otros tipos de estrés (Sorgeloos, et al., 1986). El ciclo de vida de *Artemia* refleja soluciones de adaptación a condiciones extremas; la producción de embriones enquistados o quistes de notable resistencia (Ilustración 6), que permiten afrontar severa deshidratación, anoxia y la exposición a los rayos UV (Gilchrist, 1954; Civiera, 1993; Clegg & Gajardo, 2009; Cortez, 2012).

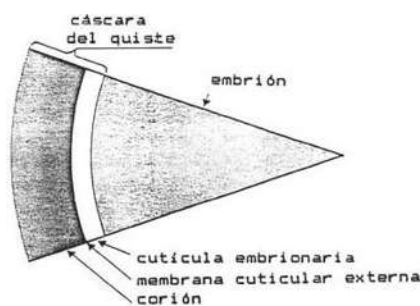


Ilustración 6. Morfología de quiste *Artemia* (Devull, 2014).

Estos quistes son metabólicamente inactivos (estado de dipausa) (Van Stappen, 1996) y no se desarrollan mientras no se mantengan las condiciones óptimas de vida adecuadas pudiendo permanecer de esta forma cinco años o más (Nunes, et al., 2006). De lo contrario al estar hidratados con oxigenación, luz, temperatura y pH adecuado, retoman su metabolismo interrumpido y después de aproximadamente

24 h, la membrana de eclosión es finalmente rota naciendo el nauplio (Ilustración 7) (primer estado larval) (Flores, 2010; Corrêa & Penafort, 2011).

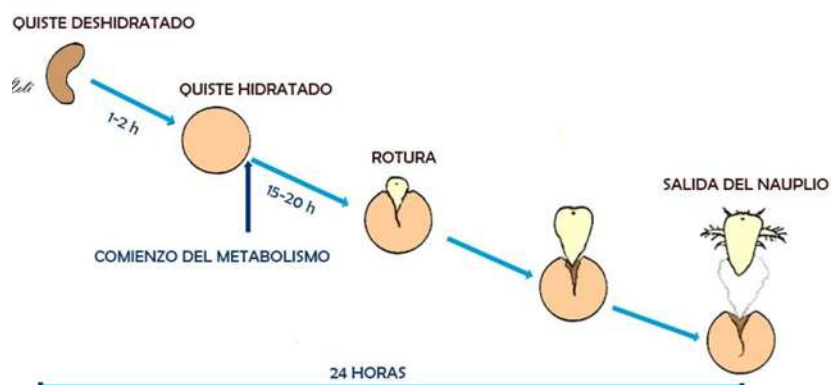


Ilustración 7. Eclosión de quiste de Artemia (Neli, 2015).

Este primer estadio se caracteriza porque su aparato digestivo todavía no es funcional permaneciendo aun cerrados boca y ano, por lo que no hay consumo de alimento (Conte, et al., 1972; Sorgeloos, 1980).

Después de las 24 h de eclosión, estos organismos mudan al segundo estadio larvario (Estado II), el aparato digestivo ya puede funcionar, sin embargo pueden sobrevivir aunque no sean alimentadas debido a que tienen reservas del saco vitelino, esto es posible solo hasta las 96 h de vida. En los siguientes tres estadios de metanauplios, cada uno con una muda, se presentan cambios importantes tanto morfológicos como funcionales; las antenas pierden su función locomotora y sufren diferenciación sexual. En el caso de los machos, se desarrollan pinzas curvadas en forma de gancho que servirán para la copula en la reproducción de tipo sexual, mientras las antenas de las hembras, degeneran en apéndices sensoriales además pueden ser fácilmente reconocidas por el saco de puesta que está situado inmediatamente detrás del último par de toracópodos (Ilustración 8) (Martinez, 2010).

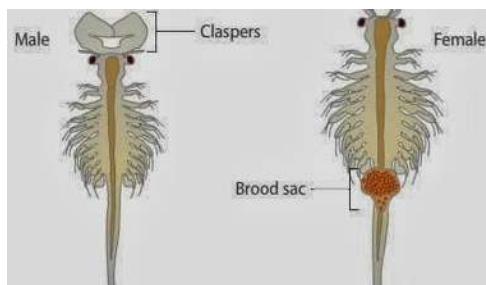


Ilustración 8. *Diferencias anatómicas entre macho y hembra de Artemia (Aquatikos, 2013).*

En condiciones adecuadas esta especie llega a su fase adulta en 20-30 días de vida y puede vivir varios meses, lográndose el desarrollo de todos los aparatos (Scherehardt, 1987). Llegan a medir 1cm de longitud aproximadamente en las poblaciones sexuales y hasta 2cm en las cepas partenogénicas (FAO, 2006).

En cuanto a la reproducción sexual (Ilustración 9), la precópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el útero y el último par de toracópodos, con sus antenas curvadas, se conoce como posición de monta (“riding position”) y así la parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes es introducido en la abertura del útero fertilizando los huevos. En el caso de las hembras partenogénicas la fertilización no tiene lugar y el desarrollo embrionario comienza tan pronto como los huevos han llegado al útero.



Ilustración 9. *Reproducción sexual de Artemia (Kenyifish, 2015).*

Los huevos fecundados se pueden desarrollar normalmente y expulsarse, o bien en condiciones extremas de vida, las glándulas de la cáscara, entran en actividad y acumulan un producto de secreción de color marrón (hematina). Los embriones solo se desarrollan hasta el estado de gástrula, momento en el cual son rodeados de una gruesa cascara (segregada por las glándulas de la cáscara), entrando en un estado de latencia o parada reversible del metabolismo embrionario y siendo liberados por la hembra. Flotan por las aguas superficiales y esperan a que

nuevamente se presenten condiciones adecuadas para iniciar una vez más el ciclo (Ilustración 10).

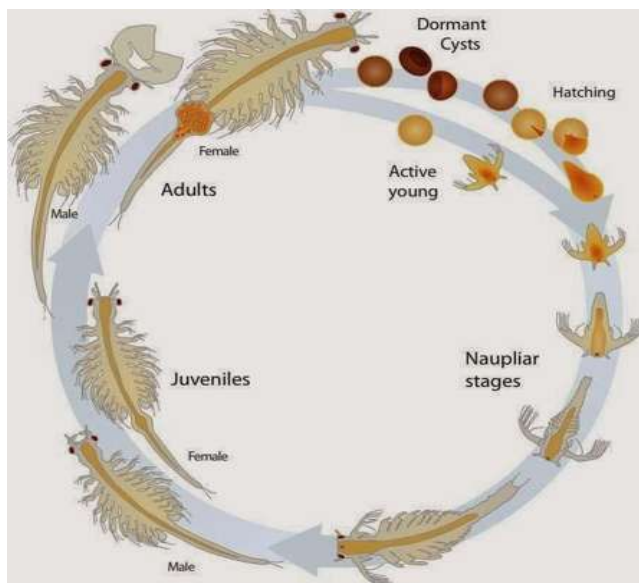


Ilustración 10. Ciclo de vida de Artemia (Jara, 2014).

2.14 Artemia franciscana: ORGANISMO DE PRUEBA

En la actualidad, es el microcrustáceo más empleado en la acuicultura como alimento vivo para larvas de muchos peces y crustáceos marinos en cultivo. La importancia de su valor nutricional radica en que es fuente rica en nutrientes, incluyendo aminoácidos esenciales y ácidos grasos altamente insaturados de la serie omega 3 que son esenciales en el desarrollo normal de los nervios y la vista en estadios iniciales de larvas de peces marinos (Cisneros & Vinatea, 2009).

Artemia es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua (Vanhaecke & Persoone, 1984). Por razones prácticas, este tipo de especies son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar. Además la disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece las siguientes ventajas: No hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente, las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario y se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica (Perez & Lazo, 2010).

Permitiendo realizar los bioensayos de forma más rápida (24 horas), barata y sencilla. Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, obteniendo resultados reproducibles y confiables, además no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras, también al ser organismos no filtradores selectivos tienen la capacidad de adaptación a consumir diferentes nutrientes, lo que resulta idóneo cuando se desean realizar estudios crónicos para analizar infinidad de contaminantes (McLaughlin, et al., 1998).

En definitiva la investigación en *Artemia* tiene un amplio espectro que va desde la evaluación de compuestos tóxicos o esenciales en los quistes (Arencibia & Tizol, 1996 ; Rodriguez, 1998) hasta la exposición tóxica aguda a diversos productos químicos (Abdullah, 1997), la detección de tóxicos en productos comestibles y farmacéuticos, estudios de modelos de acción tóxica de sustancias y de transferencia tóxica de contaminantes (Sorgeloos, et al., 1987).

3. HIPÓTESIS

La emisión continua de desechos químicos vertidos como producto de diferentes actividades industriales, entre los que se encuentra el dicromato de potasio, originan en los efluentes un riesgo sobre el ecosistema acuático, afectando al zooplancton.

4. JUSTIFICACIÓN

El manejo del dicromato de potasio por diferentes sectores en la industria ocasiona la generación de grandes concentraciones residuales de esta sustancia, los cuales son vertidos sin tratamiento al medio acuático de forma constante, provocando que se acumulen enormes cantidades de cromo, este metal ha atraído amplio interés público y de agencias regulatorias debido a la toxicidad que ejerce sobre los ecosistemas, incluyendo microorganismos y animales, incluso incrementa las posibilidades de la aparición de una respuesta tóxica en forma de biomagnificación. A pesar de estos severos problemas, los estudios realizados anteriormente sobre la toxicidad del cromo son insuficientes, debido a que precisar los límites del intervalo de concentraciones que producen efectos nocivos ante condiciones ecológicas variables y diferentes características químicas del agua es complicado. Uno de estos organismos reguladores es la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos), quien integra a este metal como uno de los principales contaminantes por sus características de elevada toxicidad, alta persistencia y rápida acumulación por los organismos vivos, quien exhorta a que se continúen realizando más investigaciones sobre distintos organismos, con el fin de aportar más información que contribuya al diagnóstico certero de los recursos hídricos y por consiguiente facilite la toma de decisiones en proyectos posteriores.

La trascendencia que tiene la utilización de muchos organismos planctónicos como bioindicadores en los estudios ecotoxicológicos, como es el caso de *Artemia franciscana*, permite extrapolar los impactos negativos de un considerable número de xenobióticos, ya que estos funcionan como un enlace entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores. Contar con este tipo de bioensayos garantiza resultados confiables, viables y de bajo costo, además de permitir el desarrollo de metodologías alternativas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad a corto plazo 24 h y 72 h del dicromato de potasio mediante la exposición a concentraciones graduales del compuesto oxidante sobre *Artemia franciscana* perteneciente al zooplancton de ambiente marino.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Determinar la Concentración Letal (LC_{50}) del dicromato de potasio sobre el 50% de la población de nauplios de 24 h y 72 h de *Artemia franciscana*.
- ✓ Establecer la máxima concentración donde no se observa respuesta de letalidad sobre *Artemia franciscana* (**NOEC**) en ambos estadios larvarios como un índice de seguridad del compuesto.
- ✓ Valorar el riesgo toxicológico del dicromato de potasio sobre este bioindicador ante la **variación de pH (4.5-8.0)**
- ✓ Evaluar el balance de oxígeno expuesto a concentraciones sub letales del dicromato de potasio basadas en la $LC_{50(24)}$, encontradas en *Artemia franciscana*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Agua marina sintética

Para la preparación de agua marina sintética se utilizó sal marina de la marca *Sera premium*, la cual está libre de silicatos, fosfatos y nitratos, en una proporción de 35 g/L de agua tridestilada y ajustando el pH a 8-8.6 (Diagrama 1).

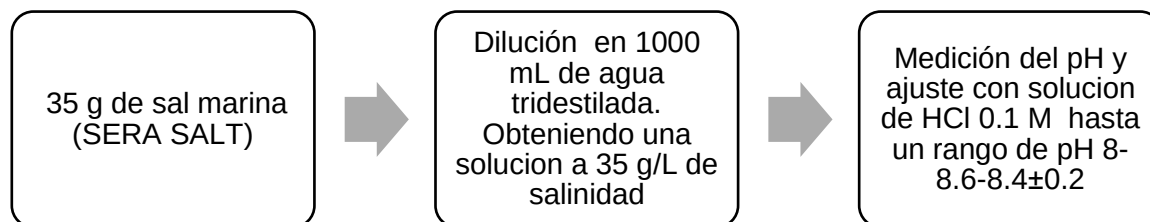


Diagrama 1. Procedimiento para la preparación de agua marina sintética.

6.2 Material biológico

Los ensayos se realizaron con quistes (huevos) de *Artemia franciscana* de Salt Creek (Salt creek, Inc), producto de E.U.A que garantizan un mínimo de 260.000 huevos/g a partir de los quistes se obtuvieron poblaciones homogéneas de nauplios (90% eclosión), con un tamaño de 500-525 μm .

Para la obtención de nauplios se agregaron aproximadamente 0.1 g de quistes de *A. franciscana* y se incubaron durante 24 h y 72 h en 150 mL de agua marina sintética, manteniendo una oxigenación constante y una temperatura de 28°C en baño térmico, aplicando iluminación con una lámpara de luz de 1000 lux.

Tabla 9. Parámetros para una óptima eclosión de nauplios de A. franciscana.

PARÁMETRO	CONDICIONES
pH	8.4±0.2
SALINIDAD	35 g/L
TEMPERATURA	28°C
LUZ	18.5-20 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ (1000 lux).

6.3 Sustancia de ensayo

Se realizó la dilución del dicromato de potasio en agua marina (Sera Premium, Germany) para la obtención de concentraciones crecientes, un primer rango de 15-100 mg L⁻¹ y de 5-25 mg L⁻¹ para la determinación de la letalidad de 24 h y 72 h respectivamente del dicromato de potasio.

6.4 Determinación de la toxicidad aguda del Dicromato de potasio en nauplios de *Artemia franciscana*

La determinación de la Concentración Letal (LC₅₀) sobre el 50% de la población, se basó en la metodología descrita por Persoone, et al. (1989) y Sanchez-Fortun, et al. (1994), que consiste en establecer la concentración que causa la muerte del 50% de nauplios de 24 h de *Artemia*. Sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos (Sarstedt Inc., USA) se incluyeron 10 nauplios de 24 h de *Artemia* en cada pocillo, éstos fueron expuestos a concentraciones crecientes de la sustancia estudio (Dicromato de potasio) en un volumen total de 1 mL (1000 µL). Estableciendo un control para cada concentración, posteriormente se incubaron las placas a 28°C por 24 h en ambiente de oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo de exposición, se realizó la lectura de cada una de las placas sometidas al ensayo, concluyendo con el conteo y registro del número de nauplios vivos y muertos de cada uno de los pocillos de cada concentración. La muerte de los nauplios se estableció por la falta de movimientos de observación directa a 2x durante 10 s bajo el estereoscopio (Carl Zeiss Microscopy). El mismo procedimiento se siguió para determinar la LC₅₀₍₇₂₎, pero empleando nauplios de 72 h. En cada caso las repeticiones del bioensayo fueron en número total de ocho (n=8).

6.5 Valoración del riesgo toxicológico del dicromato de potasio sobre *Artemia franciscana* ante la variación de pH.

Para llevar a cabo este bioensayo se requirió previamente de la realización de un control para verificar el rango de pH donde el bioindicador se mantenía vivo, estableciendo como mínimo pH ácido viable 4.5. Posteriormente se procedió a la preparación de agua marina a diferentes valores de pH (4.5-8.0), en ella se diluyo el dicromato de potasio respetando cada uno de los rangos de concentración

creciente para nauplios de 24 h y 72 h. Los bioensayos fueron repetidos ocho veces para cada pH en cada uno de los estadios.

6.6 Determinación del balance de O₂ en concentraciones sub letales del dicromato de potasio, sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

El estudio de la inhibición de la respiración celular se realizó a través del sistema Chlorolab 2 (Hansatech Instruments, Norfolk, England). La medición de oxígeno en fase líquida se basa en la aplicación de una diferencia de voltaje; el platino que constituye el cátodo se polariza, el oxígeno se reduce debido a la electronegatividad de la superficie del electrodo, formándose H₂O₂, generándose una tendencia a que la polaridad disminuya debido a los electrones cedidos al oxígeno; el circuito se cierra con KCl aportado en la membrana, y la plata del ánodo se oxida generando cloruro de plata. El oxígeno de la muestra corresponde al que se consume por la reducción del cátodo.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores de LC₅₀ 24 h y 72 h, así como sus respectivos NOEC sobre *Artemia franciscana* fueron obtenidos por regresión lineal de la relación Concentración-Respuesta por análisis Probit (Finney, 1971). El ensayo de distribución normal de los datos se realiza a través de la prueba D' Agostino y Pearson. Para determinar las diferencias estadísticas de cada LC₅₀ de ambos estadios se realizó por medio de una prueba T-student no pareada, posteriormente entre cada valor de las LC₅₀ obtenidas ante la variación de pH de 24 h y 72 h se efectuó la comparación múltiple por ANOVA Test Tukey utilizando un intervalo de confianza de p<0.05.

Los cálculos estadísticos fueron realizados por el paquete estadístico Graphpad Prism v5.0 (Graph-Pad Software Inc., USA). Y finalmente para la cuantificación del oxígeno de la muestra en nmol O₂/mL se utilizó el programa informático Oxigraph Plus V. 1.01. Empleando una población de 200 nauplios a un tiempo de 120 min.

8. RESULTADOS

Se evaluó la toxicidad aguda a 24 h y 72 h de exposición del dicromato de potasio sobre nauplios de *Artemia franciscana* mediante la determinación de la respuesta de LC₅₀ de cada estadio, obteniendo los siguientes resultados:

8.1 LC₅₀₍₂₄₎

La respuesta de LC₅₀ a 24 h sobre nauplios de *Artemia franciscana* fue de 30.50 mg L⁻¹, y su respectivo 24 h-NOEC de 8.90 mg L⁻¹.

Tabla 10. Valores de LC₅₀₍₂₄₎ del dicromato de potasio.

Índices de toxicidad	mg L ⁻¹ (L.C. al 95%)
LC ₅₀₍₂₄₎	30.50 (24.30-36.60)
24 h-NOEC	8.90 (5.01-12.70)

El gráfico 1 correspondiente a la curva Concentración-Respuesta a 24 h del dicromato de potasio presentó un valor de $r=0.98$, lo que indica una correlación positiva, donde al incrementar la concentración del cromo, aumenta el porcentaje de letalidad.

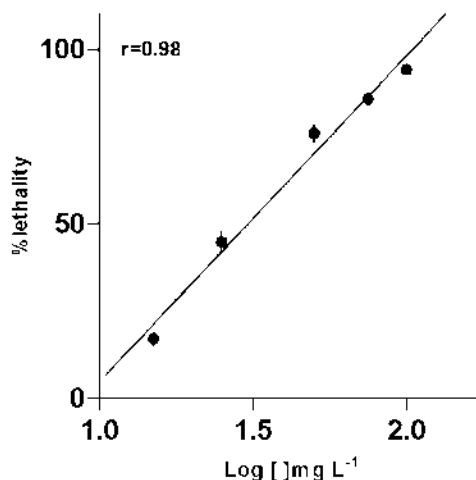


Gráfico 1. Curva Concentración-Respuesta del dicromato de potasio a 24 h de exposición sobre *A. franciscana*.

8.2 LC₅₀₍₇₂₎

La respuesta de la LC₅₀ a 72 h sobre nauplios de *Artemia franciscana* fue de 16.5 mg L⁻¹ y su NOEC de 5.8 mg L⁻¹, ambos valores son menores al comparar con los resultados a 24 h, indicando que se requiere por lo menos la mitad de la concentración requerida a la letalidad a las 24 h.

La tabla 11 muestra los valores ya mencionados, con sus respectivos límites de confianza al 95%.

Tabla 11. Valores de LC₅₀₍₇₂₎ del dicromato de potasio.

Índices de toxicidad	mg L ⁻¹ (L.C. al 95%)
LC ₅₀₍₇₂₎	16.50 (9.90-68.23)
72 h-NOEC	5.80 (0.15-9.70)

De igual forma en el gráfico 2, se puede apreciar que es necesaria una concentración menor para causar tal efecto, lo cual nos indica que en esta etapa naupliar el bioindicador es mucho más sensible a los efectos del dicromato de potasio que a 24 h.

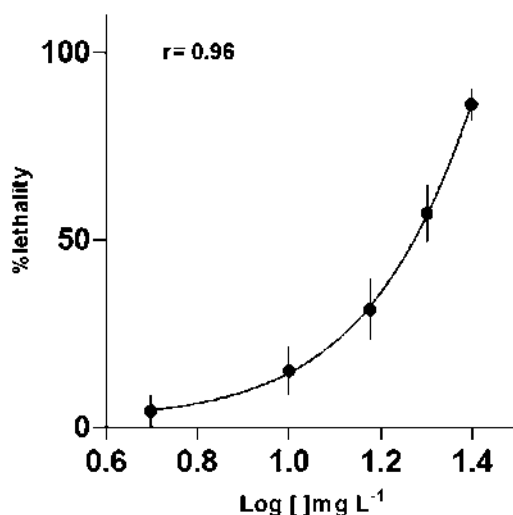


Gráfico 2. Curva Concentración-Respuesta del dicromato de potasio a 72 h de exposición sobre *A. franciscana*.

8.2.1 Comparación de LC_{50} de 24 h y 72 h del dicromato de potasio sobre *A. franciscana*.

Las LC_{50} de ambos estadios larvarios evidencian en la prueba T-student no pareada (Tabla 12) que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Sin embargo, experimentalmente la fase de 72 h es ligeramente más sensible ya que se requiere una concentración menor de esta sustancia oxidante en comparación con el ensayo a 24 h para causar tal respuesta (Gráfico 3).

Tabla 12. Resultados de la prueba T-student de $LC_{50(24)}$ Vs $LC_{50(72)}$

Table Analyzed	
Column A	Cr 24 h
Vs	Vs
Column B	Cr 72 h
Unpaired t test	
P value	0,2627
P value summary	Ns
Are means signif. different? ($P < 0.05$)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.205 df=8
How big is the difference?	
Mean $\pm$ SEM of column A	63.57 $\pm$ 14.30 N=5
Mean $\pm$ SEM of column B	38.80 $\pm$ 14.77 N=5
Difference between means	24.77 $\pm$ 20.56
95% confidence interval	-22.64 to 72.17
R squared	0,1536
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.067, 4, 4
P value	0,9511
P value summary	Ns
Are variances significantly different?	No

T-test

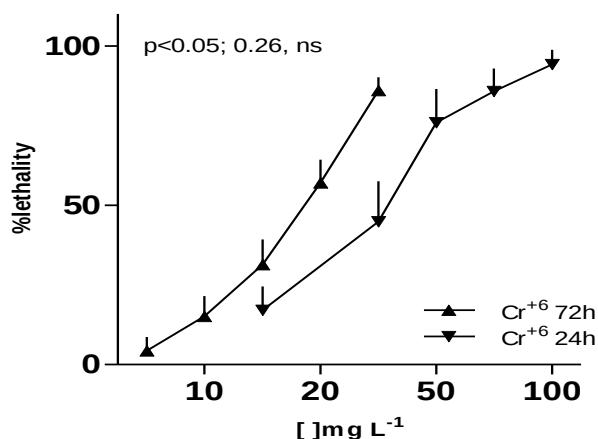


Gráfico 3. Comparación de curvas Concentración-Respuesta a 24 h y 72 h del dicromato de potasio.

8.3 Variación de la toxicidad del Dicromato de potasio por cambios en pH a 24 h

8.3.1 pH 4.5

En la Tabla 13 podemos observar el valor obtenido para la LC_{50} a 24 h del dicromato de potasio a pH 4.5, en este resultado se aprecia que experimentalmente existe una ligera diferencia en cuanto al obtenido al pH control de 8 (30.50 mg L^{-1}). La NOEC disminuyó a 8.81 mg L^{-1} , sin presentar efectos observables de mortalidad.

Tabla 13. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 4.5

Índices de toxicidad	Valores en mg L^{-1} (L.C. al 95%)
24 h-NOEC	8.81 (6.93-10.52)
$LC_{50(24)}$	22.60 (20.37-24.83)
24 h-LOEC	8.97 (7.10-10.72)
r	0.99

En el gráfico 4 la curva correspondiente para la $LC_{50(24)}$ del dicromato de potasio a pH 4.5 presenta un valor del coeficiente de correlación lineal de 0.99, la dependencia se hace casi total en las dos variables ya que cuando la concentración del cromo aumenta, el porcentaje de letalidad también lo hace en forma proporcional.

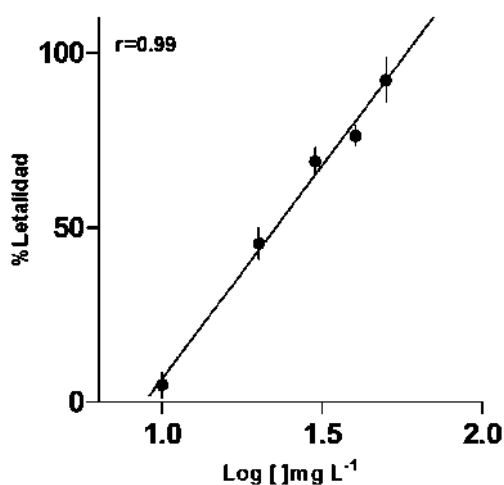


Gráfico 4. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH de 4.5

8.3.2 pH 5.0

La respuesta de la $LC_{50(24)}$ obtenida a pH 5 (Tabla 14), que en contraste con el resultado del pH anterior más ácido, muestra un valor aumentado. Se requiere una concentración levemente más alta para ejercer los efectos letales sobre nauplios de *A. franciscana*.

Tabla 14. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5

Índices de toxicidad	Valores en mg L^{-1} (L.C. al 95%)
24 h-NOEC	8.88 (7.20-10.45)
$LC_{50(24)}$	23.12 (21.10-25.20)
24 h-LOEC	9.05 (7.33-10.62)
r	0.99

El gráfico 5 nos determina que la curva Concentración-Respuesta tras 24 h de exposición al dicromato potasio con un pH de 5 presenta alto valor del coeficiente de correlación lineal ($r=0.99$) por lo cual existe una relación directa entre estas dos variables.

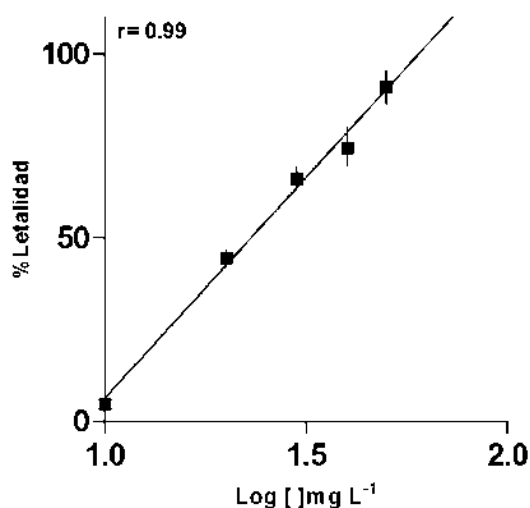


Gráfico 5. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5

8.3.3 pH 5.5

La $LC_{50(24)}$ obtenida de este compuesto oxidante a pH de 5.5, fue un valor similar al obtenido en los bioensayos a pH control (8) de este mismo estadio larvario, evidenciando con los resultados anteriores, que a pH más ácidos el dicromato de potasio se comporta ligeramente más tóxico.

Tabla 15. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5

Índices de toxicidad	Valores en $mg\ L^{-1}$ (L.C. al 95%)
24 h-NOEC	9.60 (5.64-13.40)
$LC_{50(24)}$	31.04 (25.00-37.00)
24 h-LOEC	9.80 (5.81-13.65)
r	0.98

En el gráfico 6 se aprecia la curva Concentración-Respuesta a 24 h del dicromato de potasio donde el 99% de los datos obtenidos a este valor de pH corresponden a una relación directa mostrando incremento de letalidad en conjunto con el aumento de las concentraciones ensayadas con un valor del coeficiente de correlación lineal ($r = 0.98$).

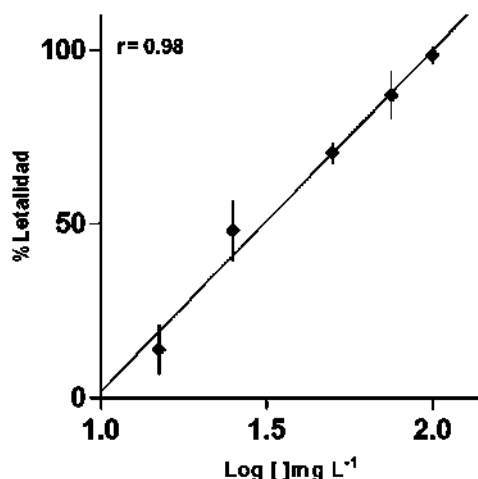


Gráfico 6. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5

8.3.4 pH 6.0

El último pH evaluado a 24 h fue de 6, la respuesta de LC₅₀₍₂₄₎ fue semejante respecto al control durante un mismo tiempo de exposición, lo que sugiere que a valores de pH óptimos para *A. franciscana* el dicromato de potasio genera un menor riesgo comparado a pH ácidos.

Tabla 16. Índices de toxicidad a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6.

Índices de toxicidad	Valores en mg L ⁻¹ (L.C. al 95%)
24 h-NOEC	9.22 (4.84-13.50)
LC ₅₀₍₂₄₎	32.96 (25.88-40.20)
24 h-LOEC	9.46 (5.02-13.77)
r	0.97

El gráfico 7 en la curva Concentración-Respuesta a 24 h del dicromato de potasio a pH 6, muestra un valor del coeficiente correlación $r = 0.97$, indicando la relación positiva entre la concentración del tóxico y el porcentaje de mortalidad.

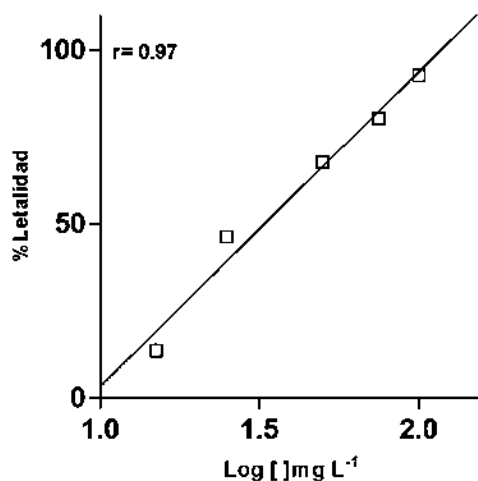


Gráfico 7. Curva Concentración-Respuesta a 24 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6.

8.4 Estudio de la LC₅₀ a 72 h con diferentes pH

8.4.1 pH 4.5

En esta etapa se determinaron los mismos parámetros para cada pH. En el caso del pH 4.5 se obtuvo una LC₅₀₍₇₂₎ de 12.33 mg L⁻¹ y su respectivo NOEC de 4.60 mg L⁻¹ y un LOEC de 4.70 mg L⁻¹, este último índice indica la concentración más baja del tóxico de las empleadas en el bioensayo que causa una respuesta de mortalidad en la población estudiada (Tabla 17).

Tabla 17. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 4.5

Índices de toxicidad	Valores en mg L ⁻¹ (L.C. al 95%)
72 h-NOEC	4.60 (2.64-6.25)
LC ₅₀₍₇₂₎	12.33 (10.02-14.93)
72 h-LOEC	4.70 (2.71-6.35)
r	0.96

En el gráfico 8 se puede observar la curva Concentración-Respuesta del dicromato de potasio a 72 h de exposición sobre nauplios de *A. franciscana* a pH 4.5. El coeficiente de correlación indica ($r= 0.96$) que a un pH ácido se requiere una concentración menor para establecer tal efecto.

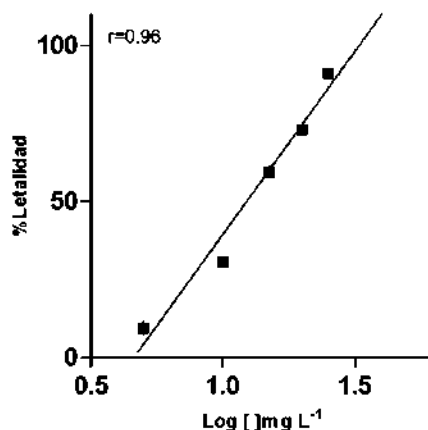


Gráfico 8. Curva concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 4.5

8.4.2 pH 5.0

A pH 5 se obtuvo una respuesta de $LC_{50(72)}$ (Tabla 18), similar al pH anterior, sin embargo en comparación con el obtenido en el pH control ($LC_{50(72)}=16.50 \text{ mg L}^{-1}$) se observa una disminución, requiriéndose una concentración menor para producir la respuesta. Lo mismo sucede con los vales de NOEC y LOEC, los cuales sufrieron cambios muy ligeros, con respecto al pH de 4.5 en el mismo tiempo de exposición.

Tabla 18. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.

Índices de toxicidad	Valores en mg L^{-1} (L.C. al 95%)
72 h-NOEC	4.55 (3.15-5.77)
$LC_{50(72)}$	12.10 (10.42-13.86)
72 h-LOEC	4.64 (3.23-5.87)
r	0.98

El gráfico 9 muestra la curva resultado del aumento de la respuesta dependiente de la concentración obtenida por análisis Probit, a 72 h de exposición del tóxico a pH 5.0

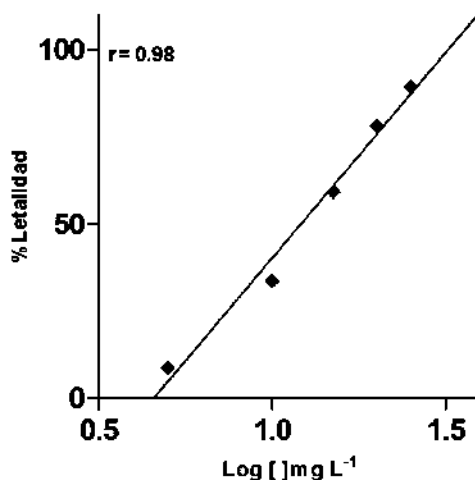


Gráfico 9. Curva Concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.

8.4.3 pH 5.5

Continuando con la respuesta a pH de 5.5 (Tabla 19) se obtuvo un resultado para la $LC_{50(72)}$ de 13.30 mg L^{-1} . El índice de toxicidad NOEC señala que a 4.84 mg L^{-1}

se da la concentración más alta del tóxico, de las empleadas en este bioensayo que no causa un efecto observable (en este caso letalidad).

Tabla 19. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5

Índices de toxicidad	Valores en mg L ⁻¹ (L.C. al 95%)
72 h-NOEC	4.84 (2.46-6.75)
LC ₅₀₍₇₂₎	13.30 (10.54-16.40)
72 h-LOEC	4.94 (2.54-6.86)
r	0.95

En el gráfico 10 se aprecia la pendiente que corresponde a este pH y tiempo de exposición, como **resultado del aumento de la respuesta dependiente de la concentración** obteniendo un valor del coeficiente de correlación $r=0.95$.

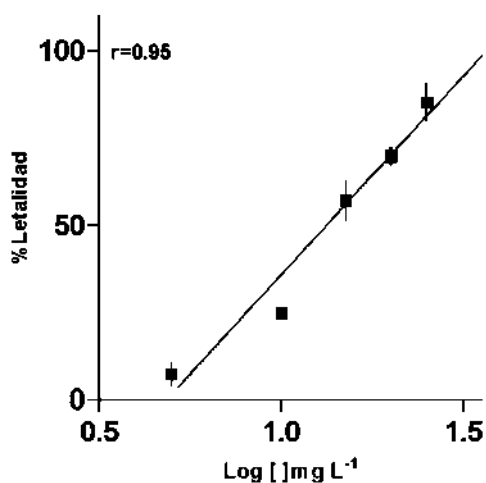


Gráfico 10. Curva Concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 5.5

8.4.4 pH 6.0

Finalmente con el valor de pH 6 ensayado se obtuvieron los siguientes resultados que podemos apreciar en la tabla 20 para la CL₅₀₍₇₂₎, NOEC y LOEC. En el gráfico 11 se muestra la curva Concentración-Respuesta correspondiente para este pH, con un coeficiente de correlación $r= 0.92$

Sí contrastamos los valores obtenidos para cada índice de toxicidad con el resultado anterior, las diferencias son mínimas, aunque si observa que a valores de pH más ácidos se requiere una concentración menor del dicromato de potasio para causar letalidad.

Tabla 20. Índices de toxicidad a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6.

Índices de toxicidad	Valores en mg L ⁻¹ (L.C. al 95%)
72 h-NOEC	5.03 (1.60-7.61)
LC ₅₀₍₇₂₎	13.30 (9.40-19.14)
72 h-LOEC	5.13 (1.65-7.72)
r	0.92

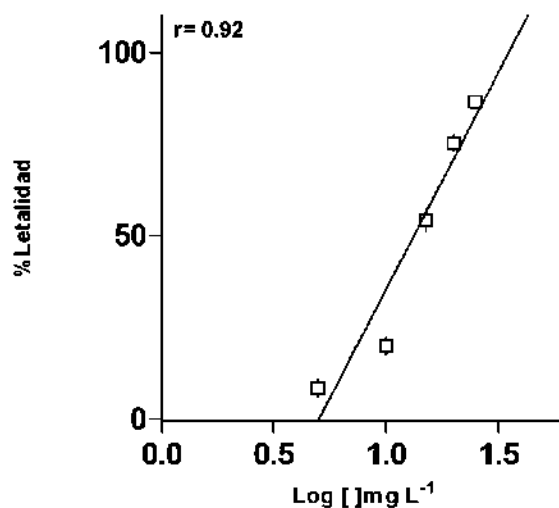


Gráfico 11. Curva Concentración-Respuesta a 72 h de exposición del dicromato de potasio a pH 6

8.5 COMPARACIÓN 24 h Y 72 h CON RESPECTO A LA VARIACIÓN DE pH

8.5.1 24 h

Después de haber obtenido la LC_{50} en cada pH, se efectuó la comparación de este parámetro con los resultados a pH control, en el estadio de 24 h.

En el siguiente gráfico se observa que el dicromato de potasio a pH de 4.5 ejerce mayor respuesta tóxica a concentraciones menores, aunque ciertamente para establecer diferencias con el resto de los valores de pH ensayados, son necesarias concentraciones similares para realizar efectos letales.

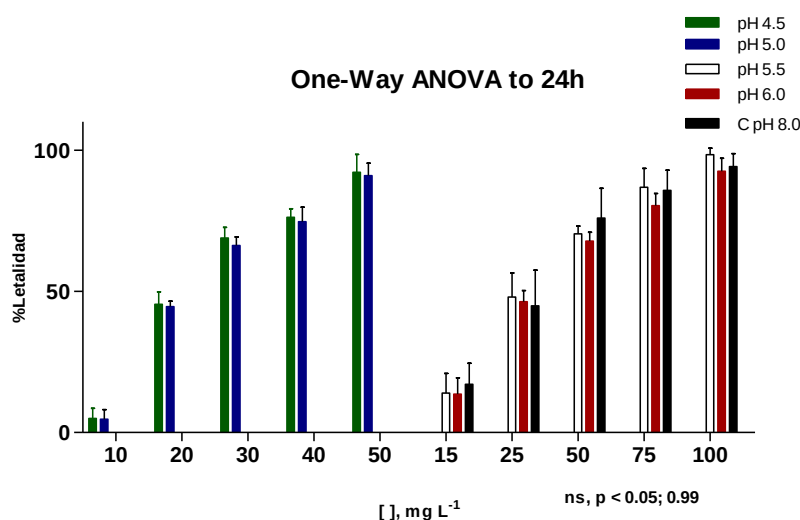


Gráfico 12. Comparación de las LC_{50} obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 24 h de exposición del dicromato de potasio.

Para establecer diferencias estadísticas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, el cual muestra como resultados que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las LC_{50} del pH control y las obtenidas ante una variación de pH como se muestra en la Tabla 21 ($p < 0.05$; 0.99), lo que significa que son concentraciones similares del dicromato de potasio las que se necesitan para causar tal efecto. Sin embargo, experimentalmente si se aprecia que a pH bajos esta sustancia requiere una concentración menor para causar letalidad, aunque la disminución tampoco es tan notable.

Tabla 21. Resultados ANOVA de la comparación de las LC_{50} obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 24 h.

Table Analyzed	C pH 24 h		
One-way analysis of variance			
P value	0,9944		
P value summary	Ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	5		
F	0,05262		
R squared	0,01041		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	0,03826		
P value	0,9998		
P value summary	Ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	226,1	4	56,53
Residual (within columns)	21490	20	1074
Total	21710	24	

Así mismo se efectuaron comparaciones múltiples, la primera de cada pH ensayado por medio de un Test de Tukey (Tabla 22), y la segunda de cada pH ensayado pero únicamente con el pH control por medio de Test de Dunnett (Tabla 23) y ambas indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Tabla 22. Resultados de Test Tukey del dicromato de potasio ante variación de pH a 24 h.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
pH 4.5 vs pH 5.0	1,308	0,08926	No	ns	-60.73 to 63.34
pH 4.5 vs pH 5.5	-5,980	0,4080	No	ns	-68.01 to 56.05
pH 4.5 vs pH 6.0	-2,582	0,1761	No	ns	-64.62 to 59.45
pH 4.5 vs pH 8.0	-6,032	0,4115	No	ns	-68.07 to 56.00
pH 5.0 vs pH 5.5	-7,288	0,4972	No	ns	-69.32 to 54.75
pH 5.0 vs pH 6.0	-3,890	0,2654	No	ns	-65.92 to 58.14
pH 5.0 vs pH 8.0	-7,340	0,5008	No	ns	-69.37 to 54.69
pH 5.5 vs pH 6.0	3,398	0,2318	No	ns	-58.64 to 65.43
pH 5.5 vs pH 8.0	-0,05200	0,003548	No	ns	-62.09 to 61.98
pH 6.0 vs pH 8.0	-3,450	0,2354	No	ns	-65.48 to 58.58

Tabla 23. Resultados de Test de Dunnett del dicromato de potasio con respecto al pH control a 24 h.

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
pH 8.0 vs pH 4.5	6,032	0,2910	No	ns	-48.93 to 60.99
pH 8.0 vs pH 5.0	7,340	0,3541	No	ns	-47.62 to 62.30
pH 8.0 vs pH 5.5	0,05200	0,002509	No	ns	-54.91 to 55.01
pH 8.0 vs pH 6.0	3,450	0,1664	No	ns	-51.51 to 58.41

8.5.2 72 h

En cuanto a la fase de 72 h, se aprecia en el gráfico 13 que en los pH más ácidos (4.5 y 5.0) hay mayor letalidad, la cual va incrementándose de forma gradual hasta llegar a las concentraciones máximas ensayadas, lo que significa que el dicromato de potasio muestra mayor toxicidad en un ambiente ácido, debido a que se produce cromo hexavalente.

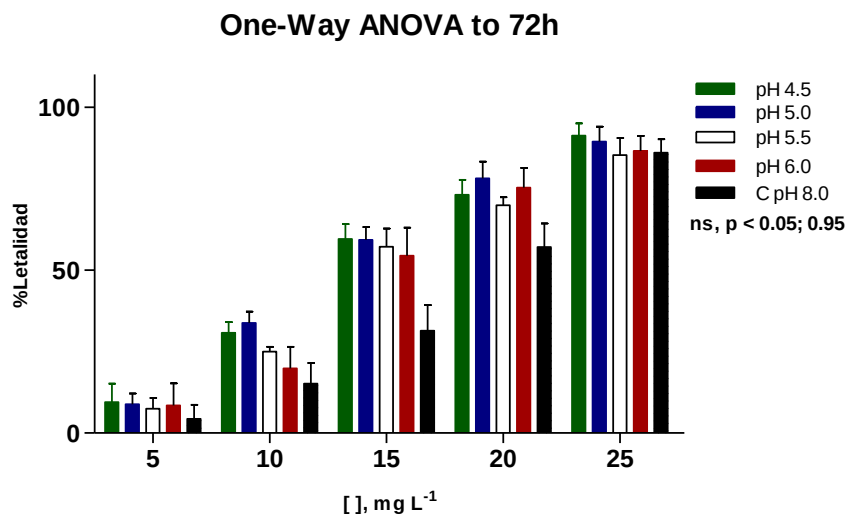


Gráfico 13. Comparación de las LC_{50} obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 72 h de exposición del dicromato de potasio.

A si mismo después de llevar acabo el análisis correspondiente, los resultados obtenidos señalan que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las LC_{50} del pH control y las obtenidas ante una variación de pH, es decir que son concentraciones semejantes del dicromato de potasio que se requieren para causar respuesta. Sin embargo, experimentalmente es evidente que a valores de pH más ácidos esta sustancia necesita una concentración menor para producir efecto, además que esta etapa naupliar de *Artemia franciscana* se evidencia una mayor sensibilidad.

Tabla 24. Resultados ANOVA de la comparación de las LC_{50} obtenidas a pH control y ante la variación de pH a 72 h.

Table Analyzed	C pH 72 h		
One-way analysis of variance			
P value	0,9545		
P value summary	Ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	5		
F	0,1633		
R squared	0,03163		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	0,01251		
P value	1,0000		
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table	SS	Df	MS
Treatment (between columns)	709,5	4	177,4
Residual (within columns)	21720	20	1086
Total	22430	24	

Con respecto a los resultados obtenidos en las comparaciones múltiples, primero de cada pH ensayado por medio de un Test de Tukey (Tabla 25) y después de cada pH contra el pH control por medio del Test de Dunnett (Tabla 26) ambos análisis indican que no existen diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) .

Tabla 25. Resultados de Test Tukey del dicromato de potasio ante variación de pH a 72 h de exposición.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
pH 4.5 vs pH 5.0	-1,041	0,07063	No	Ns	-63.41 to 61.33
pH 4.5 vs pH 5.5	3,863	0,2621	No	Ns	-58.51 to 66.24
pH 4.5 vs pH 6.0	3,917	0,2658	No	Ns	-58.46 to 66.29
pH 4.5 vs pH 8.0	14,03	0,9518	No	Ns	-48.34 to 76.40
pH 5.0 vs pH 5.5	4,904	0,3327	No	Ns	-57.47 to 67.28
pH 5.0 vs pH 6.0	4,958	0,3364	No	Ns	-57.42 to 67.33
pH 5.0 vs pH 8.0	15,07	1,022	No	Ns	-47.30 to 77.44
pH 5.5 vs pH 6.0	0,05440	0,003691	No	Ns	-62.32 to 62.43
pH 5.5 vs pH 8.0	10,17	0,6897	No	Ns	-52.21 to 72.54
pH 6.0 vs pH 8.0	10,11	0,6860	No	Ns	-52.26 to 72.48

Tabla 26. Resultados de Test de Dunnett del dicromato de potasio con respecto al pH control a 72 h de exposición.

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
pH 8.0 vs pH 4.5	-14,03	0,6730	No	ns	-69.29 to 41.23
pH 8.0 vs pH 5.0	-15,07	0,7230	No	ns	-70.33 to 40.19
pH 8.0 vs pH 5.5	-10,17	0,4877	No	ns	-65.42 to 45.09
pH 8.0 vs pH 6.0	-10,11	0,4851	No	ns	-65.37 to 45.15

8.6 Cinética del balance de O₂ en *A. franciscana*

En el gráfico 14 se demuestra la disminución del balance de oxígeno a un valor de ~60% a través de una concentración sub letal a partir de la LC₅₀₍₂₄₎ obtenida en otros ensayos de 20mg L⁻¹, en un tiempo de 2 h, con un porcentaje de inhibición de nmolO₂/mL de muestra: 58.37% ± 1.357.

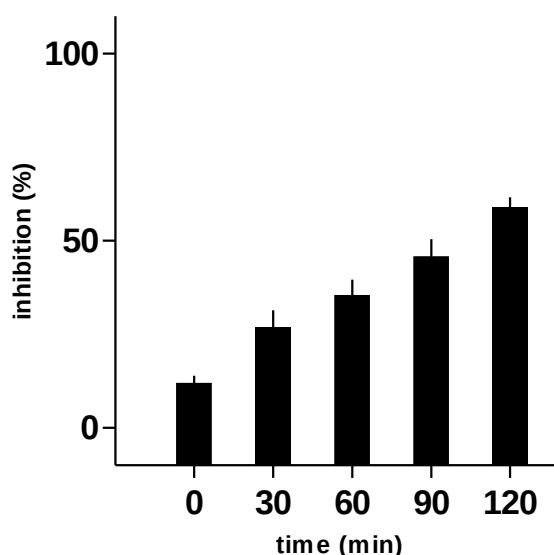


Gráfico 14. Cinética del dicromato de potasio.

En el estudio cinético de balance de oxígeno en *A. franciscana* intoxicada con dicromato de potasio se advierte que si aumenta el tiempo de exposición, se incrementa el déficit de oxígeno como se observa en el gráfico 15.

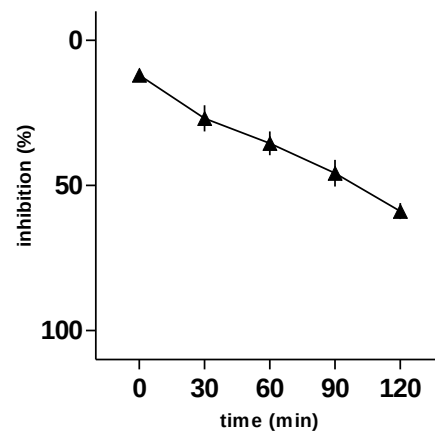


Gráfico 15. Porcentaje de inhibición de O_2 ante exposición del dicromato de potasio a 120 min.

9. DISCUSIÓN

La toxicología reguladora ha puesto cada vez mayor énfasis en la evaluación de los riesgos que presentan las sustancias químicas sobre la salud pública y ambiental, para lo cual realiza ensayos con animales. Debido a la presión pública y a la de los mismos científicos, existe una tendencia creciente a aplicar el principio de tres R en la investigación con animales, se refieren a *reemplazar* los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, *reducir* su número cuando sea necesario utilizarlos y *refinar* las técnicas para aminorar su sufrimiento, este hecho se manifiesta en las propias legislaciones de los países y todo ello ha llevado a la investigación de métodos alternativos a los tradicionales. Los métodos *in vitro* son muy fiables pero, debido a que son más restrictivos, sólo sirven para predecir la toxicidad de un determinado tipo de sustancias o de un aspecto concreto del proceso de toxicidad, por lo cual es necesario realizar una batería de ensayos (Vinardell, 2007). Tests con simples microorganismos están siendo utilizados como indicadores anticipados de químicos probablemente perjudiciales, y son frecuentemente más rápidos, más baratos y más éticos que los experimentos con animales (Carballo, et al., 2002). Con nuestros resultados podemos comprobar que el modelo de *Artemia franciscana* es un bioensayo económico de fácil manejo que permite relacionar toxicidad con concentración, además de aportar resultados preliminares valiosos para proponer ensayos más elaborados.

9.1 LC₅₀ de Cr en especies acuáticas

De acuerdo a los resultados obtenidos de las LC₅₀ a 24 h y 72 h de exposición del dicromato de potasio ensayado sobre nauplios de *A. franciscana* se demuestra que, la fase correspondiente a 72 h (LC₅₀ de 16.50 mg L⁻¹) es la que evidencia una toxicidad superior a menor concentración, seguida en la respuesta de mortalidad a 24 h (LC₅₀ de 30.50 mg L⁻¹), lo que sugiere que a mayor tiempo de exposición se necesita una concentración menor para que esta sustancia oxidante presente una mayor respuesta de letalidad. Ambos resultados están en el rango de valores reportados en la literatura para ensayos agudos en invertebrados acuáticos (0,067-59,9 mg/L) (UNEP, 1988). En cuanto al bioindicador utilizado *A. franciscana*, este

presento una gran sensibilidad a las 72 h de exposición ante dicromato de potasio lo cual coincide con (Sánchez-Fortún, et al. 1995; Barahona, et al. 1994; Cortez, 2012), quienes mencionan que en este estadio naupliar de setenta y dos horas el bioindicador muestra alta sensibilidad a distintos xenobioticos. La explicacion a lo anterior se debe a que las mudas en *Artemia franciscana* son muy frecuentes, aproximadamente 15 en total a partir del primer estadio y los *nauplios* presentan una cutícula muy fina lo que las hace especialmente más susceptibles al tóxico (cromo VI), el cual penetra fácilmente a través de las barreras fisiológicas absorbiéndose rápidamente y provocando diferentes alteraciones en estos organismos, efectos que van desde los sub letales sobre la fotosensibilidad, movilidad, la reproducción y la hematología, hasta la muerte de la larva (Gonzales & Aportella, 2001).

Sin embargo hay algunos datos que señalan que la suceptibilidad a los diferentes contaminantes puede variar en las distintas fases de desarrollo (Shazili & Pascoe, 1986). Los autores Bartolome & Sanchez (2007) destacan que los ensayos de toxicidad normalizados se realizan empleando organismos en etapas juveniles, debido a un mayor registro de sensibilidad, lo que permite lograr resultados que establezcan niveles de seguridad superiores frente a las exposiciones.

En particular, los estudios realizados sobre los efectos tóxicos agudos del cromo en organismos acuáticos se muestran a manera de resumen en la siguiente tabla:

Tabla 27. *LC₅₀ del Cr en organismos acuáticos.*

		Especie	Resultados LC ₅₀	Periodo de exposición	Referencia
	Cladóceros	- <i>Daphnia magna</i>	3.35 mg/L	24 h	(Rico-Martínez et al., 2001)
		- <i>Daphnia pulex</i>	1.76 mg/L		
		- <i>Simocephalus vetulus</i>	3.37 mg/L		
		- <i>Daphnia exilis</i>	0.1170 mg/L	48 h	(Jerónimo, et al., 2008)
		- <i>Daphnia pulex</i>	0.13 mg/L	48 h	(Velandia & Montañez, 2010)

Zooplancton			0.145 mg /L	24 h	(Silva, et al., 2003)
			0.2958mg/L	48 h	(Piñeros & Quintero., 2008)
		- <i>Brachionus calyciflorus cepa Gainesville</i>	4 x10 ⁻⁶ mg/L	24 h	(Hernández ., 2015)
		- <i>Brachionus calyciflorus cepa San Pancho</i>			
		- <i>Lecane quadridendata</i>	4.7x10 ⁻⁵ mg/L		
	Rotíferos	- <i>Lecane luna</i>	3.26 mg/L	24 h	(Pérez-Legaspi, 2000)
		- <i>Lecane hamata</i>	4.41 mg/L		
		- <i>Lecane quadridentata</i>	4.50 mg/L		
	Braquiópodos	- <i>Artemia franciscana</i>	30.50 mg/ L y 16.50 mg/L	24 h y 72 h	(Ruiz, 2016)
			19mg/L	24 h	(Cortes, et al., 2015)
		- <i>Artemia salina</i>	12.5mg/L	24 h	(Gonzales & Aportella., 2001)
Fitoplancton	Algas	- <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	14.6mg/L	72 h	(Pereira., 2013)
Peces		- <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	35.1, 27.5, 24.0 y 21.4 mg/L	24, 48, 72 y 96 h	(Vera & Soloneski S., 2011)
		- <i>Labeo rohita</i>	39,40 mg/L	96 h	(Vutukuru., 2005)
		- <i>Channa punctatus</i>	41,75 mg/L	96 h	(Mishra & Mohanty., 2008)

Como puede apreciarse en la tabla anterior la diversidad sobre la respuesta obtenida del cromo en diferentes especies puede ser debida a que este metal ingresa en algunos organismos acuáticos por medio de distintos tipos de transporte

(ej: difusión pasiva) (EPA, 1978). Por lo tanto la toxicidad para los diferentes grupos, especies y estadios no es la misma ya que varía de acuerdo con las condiciones ecológicas y a las características químicas del agua de sus respectivos hábitats y por supuesto el tiempo de exposición. En relación a las especies, se ha podido observar que las especies de invertebrados como los crustáceos son más sensibles a sus efectos que los vertebrados como los peces (Gonzales & Aportella, 2001; Botello, et al., 2005). Debido a esta particularidad, hemos basado la elección de nuestro bioindicador.

Lilius, et al. (1995) indican que ciertos organismos acuáticos con un tamaño más grande de cuerpo son más tolerantes, es decir resisten mayores concentraciones de sustancias nocivas ya que tienen una proporción más extensa de área, superficie y volumen en comparación con pequeñas especies que son más susceptibles a conducir acumulaciones de compuestos tóxicos. Aunque esto no siempre es así y se debe tener en cuenta que la exposición continua a la contaminación puede inducir respuestas de adaptación a la contaminación (Agra, et al., 2010). Por lo tanto es importante entender que si existe alta tolerancia mostrada por algunas especies puede ser el resultado de una exposición crónica permanente a la contaminación de sus respectivos hábitats (Reboleira, et al., 2013).

En este contexto las publicaciones de Corradi, et al., (1995) demuestran que con solo cultivar el alga *Scenedesmus acutus* en presencia de 1 mg/L de Cr (VI) se forman conglomerados o agregados celulares producidos en la primera etapa de la reproducción sexual, que da lugar a cuatro pequeñas células flageladas que se identificadas como gametos, la reacción anterior se puede considerar como un intento de las algas para sobrevivir en un ambiente desfavorable.

9.2 Variación de la toxicidad del dicromato de potasio ante cambios de pH

Los primeros estudios realizados sobre el papel que ejerce la acidez en la toxicidad de los metales fueron realizados por Campbell & Stokes (1985), quienes mencionan que la acidificación de los diferentes cuerpos de aguas pueden ser en principio una influencia para interacciones de metal-organismo en al menos dos formas: la disminución en el pH puede afectar a forma química del metal en solución,

o puede afectar a la sensibilidad biológica en el nivel de la superficie celular, esto es mediante una interacción que le permita al metal atravesar la membrana celular y provocar una respuesta biológica. Para ello consideró estos posibles daños en un rango de pH 7- 4. Sin embargo, sus estudios se centraron solamente en 10 metales (Ag, Al, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn). Los resultados fueron pocos y no podían permitir generalizaciones, por ello el estudio en este campo ha precisado ampliar los resultados a más metales y bajo diferentes condiciones experimentales, incluyendo distintos organismos acuáticos (Brake, et al., 1986).

El cromo, una sustancia de potencial preocupación, aparece involucrado en la acidificación de cuerpos de agua; actualmente se han reportado escasos estudios que evalúen el comportamiento de dicho metal ante este parámetro, limitándose a unas pocas publicaciones y dirigidas solo a ciertas especies marinas. Tal es el caso de la investigación desarrollada por Putte, et al., (1987) quienes fueron los primeros en evaluar la toxicidad aguda del Cr (VI) en peces, específicamente en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) afirmando que la toxicidad de este metal aumentó al disminuir el pH en el rango de 7.8 a 6.5. Observándose cambios morfológicos asociados con el envenenamiento agudo del Cr (VI) incluso desde el pH más alto evaluado, encontrándose daños en las branquias, los riñones y el estómago, mientras que a pH 6.5 parecía estar restringido a sólo las branquias. Sin embargo, esa afectación resulta ser letal ya que se daña la función respiratoria vital de estos seres vivos debido a que estos órganos están en contacto directo con el medio acuático y de ahí su importancia como efectores en la regulación iónica y osmótica. Las conclusiones de su estudio esclarecieron que ambos valores de pH, producían alteraciones en la osmolaridad y hematocrito, características plasmáticas sanguíneas que se encuentran en los peces y son necesarias para sobrevivir ante una exposición de cualquier sustancia nociva. En otro estudio realizado por Hogendoor, et al., (1988) en el pez *Salmo gairdneri* afirman que con la disminución del pH, la toxicidad del Cr es de 50-200 veces superior en un rango de pH de 6.4-7.4 que a pH 7.8-8.0, lo cual comparando con nuestro estudio se observa que efectivamente existe un aumento ligero en la toxicidad sobre el bioindicador en

ambientes ácidos, aunque ese incremento tampoco es tan extremo como en la investigación anterior.

Más tarde, Stouthart, et al., (1995), en un estudio sobre exposición de huevos de carpa (*Cyprinus carpio*) previamente fertilizados ante Cr (VI) en concentraciones de 3.9 y 9.6 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ (1.14 y 2.82mg/L) pH 7.8 y 6.3 de agua evaluó el éxito de eclosión, la incidencia de la deformación de la médula espinal, la frecuencia cardíaca, movimientos de la cola, la concentración en todo el cuerpo de los elementos: Na, Mg, Ca, y la estructura de la piel y branquias. No se observaron efectos en cualquiera de los parámetros examinados a pH 7.8, mientras que 9.6 mol/L (2.82mg/L) a un pH de 6.3 se dio la disminución total de la concentración de Na en las larvas y con ello el aumento de la mortalidad.

Los estudios anteriores coincidieron con los realizados por Venkatramreddy, et al., (2009) quienes afirmaban que realmente el pH del agua tiene una gran influencia en la determinación de la biodisponibilidad de este metal para los peces teleósteos (vertebrados), como *Nuria denricus* donde aparecen efectos tóxicos asociados, ante un pH de 6.5 los cambios histológicos son predominantes en las branquias, produciéndoles en poco tiempo la muerte.

En el trabajo realizado por Solomon (2008) estudiando el daño provocado por las variaciones de acidez en el medio y diferentes concentraciones de Cr (VI), sobre poblaciones de la microalga eucariota *Dictyosphaerium chlorelloides*, cosmopolita de agua continental. Se observó a concentraciones de 0.025mg/L, en un rango de pH entre (3-7.5), que los resultados obtenidos para los valores de la concentración inhibitoria $\text{Cl}_{50(72)}$ a pH 7.5 y 4.25 dieron variaciones estadísticamente significativas entre ambos valores de pH. Sugiriendo que a pH ácido en presencia de cromo se afectaba más el crecimiento de las algas. Lo cual en comparación con nuestro estudio coincide que a pH de 4.5 hay una ligera elevación sobre el efecto letal de esta sustancia en el microcrustáceo ensayado.

Por último Sivakumar & Subbhuraam (2005), examinaron los efectos de este metal en la supervivencia, el comportamiento y la morfología de la lombriz de tierra,

Eisenia fetida, en agua a pH 6, 7 y 8. Concluyendo de igual manera que al haber una disminución en el pH del agua el resultado más notable era un aumento de la toxicidad de Cr en la lombriz, produciéndose cambios de comportamiento y alteraciones morfológicas.

9.3 Estudios de inhibición de oxígeno causado por exposiciones de cromo en organismos acuáticos

Aunque no se han realizado estudios de esta índole específicamente en organismos del genero *Artemia*, si se ha ensayado en otras especies acuáticas como peces y algas, con resultados parecidos semejantes a los nuestros pero siguen siendo escasos y limitados. Algunos de estos fueron efectuados por Pereira (2013), en el bioensayo con la microalga *Dictyosphaerium chlorelloides* donde determinó una inhibición del 80% de oxígeno y una IC₁₀₀₍₇₂₎: 20.42 mg/L para inhibición total de crecimiento.

Otro estudio desarrollado por Vutukuru (2005) determino los efectos toxicológicos en la carpa de gran consumo en la India, *Labeo rohita*. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad respiratoria normal de estos peces se vio afectada significativamente en un 70% y había una depresión en ella disminuyendo la tasa metabólica al extremo incluso desde las 24 hasta 96 h de exposición del ensayo, además de causar severos problemas hematológicos.

Después Ali, et al., (2006), analizaron en la planta acuática *Lemna gibba* una alteración relacionada con los daños producidos por el Cr sobre la proteína D1 que está involucrada en el transporte de electrones del fotosistema (PSII) originando que la biomolécula se produjera en menor cantidad afectando de manera grave la función oxigénica de la planta y perturbación sobre su crecimiento.

Algunos estudios adicionales sobre este metal fueron realizados por Van & Van (1998) sobre la capacidad citotóxica y genotóxica del cromo en líneas celulares del pez medaka (*Oryzias latipes*) En esta investigación utilizaron un ensayo de citotoxicidad clonogénico además de técnicas de inmunofluorescencia para medir la ruptura del doble filamento de ADN y evidenciar así el daño cromosómico para

medir mutagenicidad. Concluyéndose que el cromo es altamente citotóxico para las células de una manera dependiente de la dosis. Además el rompimiento del doble filamento de ADN pudo detectarse incluso a concentraciones muy bajas, también se detectaron aberraciones cromosómicas, lesiones de cromátidas e intercambios que aumentaron con la concentración.

10. CONCLUSIONES

La toxicidad del cromo hexavalente en el bioindicador de agua marina *Artemia franciscana*, resulta ser peligroso especialmente a valores de pH ácidos para este tipo de especies zooplanctónicas, poniendo en riesgo los niveles tróficos superiores con altas probabilidades de provocar un desequilibrio ecológico. Debido a que este ion aumenta su biodisponibilidad, permitiendo el ingreso de una forma más sencilla y ocasionando alteraciones que incluso son letales.

Los bioensayos, se hacen necesarios como una herramienta alternativa ante las actuales demandas para evitar los estudios de toxicidad *in vivo* tradicionales. Por lo tanto el ensayo de toxicidad empleando el bioindicador *Artemia franciscana* resultó un método rápido, económico y confiable.

11. RECOMENDACIONES

- Este estudio se puede complementar determinando el porcentaje de eclosión en quistes de *Artemia franciscana* ante la presencia de este metal.
- Así como agregar la temperatura en conjunto con el pH, como otro parámetro probable que influya en el aumento de la toxicidad del cromo.
- Existe escasa información acerca de ensayos de bioacumulación y toxicidad crónica sobre este metal limitándose solo a peces. Se manifiesta la necesidad de analizar los efectos sobre más especies acuáticas.
- Concluir con estudios en las líneas de células correspondientes que podrían servir como bioindicadores valiosos para el seguimiento y la evaluación de la toxicidad aguda de dicha sustancia a nivel celular en el medio acuático.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, A. R., 1997. Ecotoxicology of pesticides in the tropical paddy field ecosystem. *Environmental toxicology and chemistry* , 16(1), pp. 59-70.
- Abreu-Grobois, F. & Beardmore, J., 1980. International study on artemia. ii. genetic characterization of *Artemia* Populations - an electrophoretic approach: 133–146. in: the brine shrimp *Artemia*. *Morphology, genetics, radiobiology, toxicology*. Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (EDS)., 1(1), p. 345.
- Agra, A., Guilhermino, L., Soares, A. & Barata, C., 2010. Genetic costs of tolerance to metals in *Daphnia longispina* populations historically exposed to a copper mine drainage. *Environmental Toxicology*, 29(1), pp. 939-946.
- Alarcon, C. O. M., 2009. Los elementos traza. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa* , 4(3), pp. 107-123.
- Albek, M. L., Yetis, U. & Gokcay, C. F., 1997. Effects of Ni(II) on respirometric oxygen uptake. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1(48), pp. 636-641.
- Albert, L., 2006. *Introducción a la Toxicología Ambiental*. 2 ed. Mexico: Limusa.
- Albert, P. L. A., 1997. Cap 4. Contaminacion ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. En: P. L. A. Albert, ed. *Contaminacion Ambiental*. Xalapa. Ver: Sociedad Mexicana de Toxicologia., pp. 37-52.
- Ali, N. A., Dewez, D., Didur, O. & Popovic, R., 2006. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. *Photosynth Res*, 89(2), pp. 7-81.
- Alvarado, G. A., Blanco, S. R. & Mora, M. E., 2002. El cromo como elemento esencial en los humanos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas (SCIELO)*, 23(1), pp. 1-5.
- Alvarez, C. . D. & Celis, L., 1982. Distribución y concentración de hidrocarburos fosiles en sedimentos marinos y organismos del sistema lagunar Carmen y

Aquatikos, 2013. *Aquaria virtual.com*. [En línea]
Available at: <http://www.aquariavirtual.com/responsive/blog/alimento-marino/3-ciclo-de-vida-de-la-artemia>

[Último acceso: 5 Diciembre 2015].

Arencibia, G. & Tizol, R., 1996. Determinacion de metales pesados en *Artemia*. *Revista Cubana de Investigacion Pesquera.*, 1(1), pp. 69-72.

Arenzon, A., Fontana, P. R., P., C. & Raya R., R. M. T., 2003. Assesement of the freshwater annual fish *Cynopecilus Melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environmental Toxicology Chemistry* , Issue 22, pp. 2188-2190.

ATSDR, 1988. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Chromium. Pag 135.* [En línea]
Available at: www.toxicologyonline.org/docs/ATSDR/ATSDR%20Toxicological%20Profile%20for%20Chromium.pdf ([Oak Ridge, Tenn.] : Oak Ridge National Laboratory, 1988.

[Último acceso: 3 Enero 2016].

Avudainayagam, S. y otros, 2003. Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites.. *Environmental Contamination and Toxicology*, 178(1), pp. 53-91

Bamwoya, L. A., Rutherford L., A. & Henninger P., A., 1991. *Health Canada*. [En línea]

Available at: <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/index-eng.php>
[Último acceso: 17 Octubre 2015].

Bartolomé, C., M., C., & Sánchez F., R., S., 2007. Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *A. franciscana*. *Revista latinoamericana de recursos naturales*, 3 (1), pp90-97.

Barata, C., Hontoria, F. & Amat, F., 1996. Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture: Temperature and strains effects. *Aquaculture*, 142(1), pp. 171-189.

Bartlett, R., 1991. Chromium cycling in soils and water: links, gaps and methods. *Environmental Health Perspective*, Volumen 92, pp. 17-24.

Bartlett, R. J. & James, B. R., 1988. Mobility and Bioavailability of Chromium in Soils. In: Chromium in the Natural and Human Environments. *Journal of Chemistry*, 27(1), pp. 267-304.

Batley, G. E. & Florence, T. M., 1976. A novel scheme for the classification of heavy metal species in natural waters s. *Analytical Letters*, 9(1), pp. 379-388.

Bautista, Z. F., 1999. *Introduccion al estudio de la contaminacion del suelo por metales pesados*. 1 ed. Merida, Yucatan, Mexico.: Ediciones de la Universidad Autonoma de Yucatan.

Beg, M., Castro, P. & Saenz, L., 2001. Chemical contamination and toxicity of sediment from a coastal area receiving industrutrial effluents in Kuwait. *Archivo enviromental contamination toxicology*, Issue 41, pp. 289-297.

Borst, P. G. W. F. H., 1981. Ion transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 650(1), pp. 88-127.

Botello, V. A., Rendon, V. O. J., Gold-Bouchot, G. & Agraz, H. C., 2005. *Golfo de Mexico: Contaminacion e Impacto Ambiental. Diagnostico y Tendencias*. 2° ed. Coatzacoalcos.(Veracruz): Universidad Autonoma de Campeche.

Brady, D., Letebele, B., Duncan, J. R. & Rose, P. D., 1994. Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella* algae. *Water SA*, 20(1), pp. 213-218.

Brake, D. F., Cusimano, R. F. & Chapman, A., 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to trout. *Journal Fish Aquatic Science*, 1(1), pp. 113-118.

Campbell, P. G. C. & Stokes, P. M., 1985. *Acidification and toxicity of metals to Aquatic Biota*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 42(1), pp. 2034-2049.

Campbell, P. G., Twiss, M. R. & Wilkinson, K. J., 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: Implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(1), pp. 2543-2554.

Carballo, J. L., Hernandez, I. Z. L., Perez, P. & García-Grávalos, M. D., 2002. Q comparison between two brine shrimp assay to detected invitro cytotoxicity in marine natural products. *BCM Biotechnology*, 17(2).

Castello, O. F., 1993. *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Primera edición ed. Barcelona, España: University de barcelona publicaciones.

Castillo, M. G., 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Primera ed. Mexico D.F.: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.

Castro, M. J., Castro M, G. & Castro B, T., 2006. Cultivo semiintensivo de *Artemia franciscana* proveniente de la salinera del Istmo, Juchitan, Oaxaca bajo condiciones controladas en laboratorio. *Contacto S*, 60(1), pp. 49-54.

Castro, M. J. y otros, 2010. Potencial reproductivo de seis poblaciones mexicanas de *Artemia franciscana* Kellog 1906, cultivadas en laboratorio a 100 y 120 UPS. *BIOCYT (Biología, Ciencia y Tecnología)*., 12 febrero, 10(3), pp. 145-158.

Chapman, P. M., 2000. Whole effluent toxicity testing-usefulness, level of prediction, and risk assessment. *Env. Toxicol. Chem.*, Issue 19, pp. 3-13.

Chapman, P. M., 2002. Integrating toxicology and ecology : putting the "eco into ecotoxicology". *Marine pollution Bulletin* , 44(1), pp. 7-15.

Cisneros, R. & Vinatea, E., 2009. Biomass production of *Artemia franciscana* Kellogg 1906 using different diets. *Ecología Aplicada.*, 8(1), pp. 9-14.

Civiera, R., 1993. *Nutrición de camarones peneidos*. In: Cruz, L., E. ; Ricque, D., ; Mendoza, R. (EDS), Monterrey, N.L.: ASA.

Clegg, S. J. & Gajardo, G., 2009. Two highly diverged New World *Artemia* species, *A. franciscana* and *A. persimilis*, from contrasting hypersaline habitats express a conserved stress protein complement. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Septiembre, 153(4), pp. 451-1456.

CONAGUA, 2014. *Preservacion de recursos hidrologicos nacionales*. [En línea] Available at: <http://www.conagua.gob.mx/Contenido.aspx?n1=3&n2=62&n3=62> [Último acceso: 29 Octubre 2015].

Conde, P. J. M., Ramos, R. E. & Morales, B. R., 2004. El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Revista científica de ecología y medio ambiente.*, 13(2), pp. 45-78.

Conte, F. P., Hootman, P. J. & Harris., 1972. Neck organ of *Artemia* nauplii. *J. Comp. Physiol.*, Volumen 80, pp. 239-246.

Corradi, M. G., Gorbi, G. & Bassi, M., 1995. Hexavalent Chromium Induces Gametogenesis in the Freshwater Alga *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Marzo, 30(1), pp. 106-110.

Corrêa, J. M. & Penafort, J. M., 2011. considerations about biology and use of *Artemia* sp. (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). *REDVET. Revista Electronica de Veterinaria.*, 12(12), pp. 1-11.

Cortes, T. A., 2012. *Tesis: Valoracion del riesgo toxicologico agudo de tres colorantes de importancia en acuicultura sobre nauplios de Artemia franciscana.*, Morelia, Michoacan, Mexico.: s.n.

Cortes, T., A., Sánchez - Fortun, S., & Bartolomé, C., M., C. 2015. *Evaluación del riesgo toxicológico de la puesta en marcha de desaladoras sobre ecosistemas marinos a través del placton*. Madrid, España, Morelia, Michoacán: UMSNH

Costa, M. & Klein, C., 2006. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(9), pp. 777-779.

Cranston, R. E. & Murray, J. W., 1993. The Determination of Chromium Species in Natural. *Analytica Chemistry*, 23(2), pp. 275-282.

Crespo, J., 1999. Sobre la reproduccion de tres poblaciones sudamericanas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) (Crustacea Anostraca). *Bol. Soc. Biol.*, Issue 70, pp. 1-5.

Cruz, G. V. H., 2009. *Contaminación de agua potable por cromo hexavalente . caso de estudio: colonia lechería, municipio de Tultitlán, Estado de México.*, Mexico, D.F. : s.n.

De la Lanza, E. G., Hernandez, P. S. & Carbajal, P. J. L., 2000. *Organismos bioindicadores de la calidad del agua y de la contaminacion (Bioindicadores)*. Primera ed. Mexico, D. F. : Plaza y Valdes, S.A de C. V..

De los Rios, P., 2001. Crecimiento en poblaciones de *Artemia franciscana* y *A. persimilis* (Crustacea Anostraca) en condiciones controladas. *Revista de Biología Tropical.*, junio.49(2).

De los Rios, P. R. & Zuñiga, O., 2000. Biometric comparision of the frontal knob in american populations of *Artemia* (Anostraca, Artemiidae). *Revista chilena de historia natural. SCIELO*, Marzo, 73(1), pp. 1-10.

Department of Health and Human Services, 2., 2013. *Department of Health and Human Services*, 2013. [En línea] Available at: <https://www.usa.gov/federal-agencies/u-s-department-of-health-and-human-services> [Último acceso: 12 Enero 2015].

Devull, E., 2014. *Portalpez*. [En línea] Available at: <http://www.portalpez.com/la-artemia-salina-vt2425.html> [Último acceso: 10 Diciembre 2015].

Diaz, B. & Bustos, L. E. R., 2004. *Pruebas de toxicidad acuatica. Fundamentos y metodos*. Primera ed. Bogota, Colombia,: Universidad Nacional de Colombia.

Dorn, P. B. y otros, 1987. Hexvalent chromium as a referent toxicant in effluent toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.*, Issue 6, pp. 435-444.

Economou, E. M., Frei, R. & C., A., 2014. Application of chromium stable isotopes to the evaluation of Cr(VI) contamination in groundwater and rock leachates from central Euboea and the Assopos basin (Greece). *Elsevier*, 122(1), pp. 216-228.

EPA, 2004. *United States Environmental Protection Agency*. [En línea] Available at: <http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/30006MKD.pdf> [Último acceso: 20 Enero 2016].

EPA, 2015. *Environmental Protection Agency. Summary of the Clean Water Act*. [En línea] Available at: <http://www.epa.gov/laws-regulations/summary-clean-water-act> [Último acceso: 20 Enero 2016].

EPA, U., 1978. *Environmental Protection Agency*. [En línea] [Último acceso: 9 Febrero 2016].

Ercal, N., Gurer-Orhan, H. & Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress. Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), pp. 529-539.

ESHO, E. H. & S. O., 2008. *Environmental Health & Safety Online (ESHO)*. [En línea] Available at: <http://www.ehso.com> [Último acceso: 20 Enero 2016].

Fahima, N. F., Barsoumb, B. N., Eid, A. E. & Khalil, M. S., 2006. Removal of chromium(III) from tannery wastewater using activated carbon from sugar industrial waste. *Journal of hazardous materials*, p. 1.

Fahim, N., Barsoum, B., Eid, A. & Kahil, M., 2007. Removal of chromium(III) from tannery wastewater using activated carbon from sugar industrial waste. *Journal of Hazardous Materials*, 15 10, 1(2), pp. 303- 309.

FAO, 2006. *Deposito de documentos de la FAO*. [En línea]
Available at:

<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab474s/AB474S02.htm#TopOfPage>

[Último acceso: 7 Enero 2016].

FAO, 2015. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea]
Available at: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Artemia_spp/en

[Último acceso: 15 Diciembre 2015].

FDA, 2015. *U. S. Food and Drug Administration*. [En línea]
Available at:

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=101&showfr=1>

[Último acceso: 20 Enero 2016].

Finney, D. J., 1971. *Probit analysis.*, s.l.: Press Cambridge.

Flores, J., Lopez, M. S. & Albert, L. A., 1995. *La Contaminacion y sus Efectos en la Salud y el Ambiente*. 1 ed. Mexico, D.F.: Centro de Ecología y Desarrollo, A. C.

Flores, R. C. F., 2010. *Evualuacion del aporte nutricional de Artemia sp. Obtenida de manera sexual y asexual.*, Queretaro, Qro.: Centro Universitario.

Fu, F. & Wang, Q., 2011. Removal of Heavy Metal Ions from Wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, Marzo, 92(3), pp. 407-418.

Gamboa, M., Reyes, R. & Arrivillaga, J., 2008. Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de la salud ambiental. *Boletín de malariología y salud ambiental*, Agosto, 48(2), pp. 109-110.

Gilchrist, B. M., 1954. Haemoglobin in *Artemia*. *proceedings of the royal society of London.*, 143(1), pp. 136-146.

Gilling, G. Y. & Pérez, A. P., 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato. *Centro de Toxicología y Biomedicina.*, pp. 104-105.

Gonzales, P. Y. & Aportella, G. P., 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario de Toxicología*, 1(1), pp. 8-104.

Gutiérrez, M. & Miranda, J., 1994. *Estudio de Caso: Cromatos de México. Capítulo II*, Mexico, D.F.: s.n.

Hairston, N. G. J., 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography*, 41(1), pp. 1087-1092.

Hansen, A. M., Leon, Z. A. & Inclan, B. L., 1995. Fuentes de contaminación y enriquecimiento de metales en sedimentos de la cuenca Lerma- Chapala. *Ingeniería Hidráulica en Mexico*, Septiembre, 10(3), pp. 55-69.

Hernández, R. E., 2015. Estudio de la bioacumulación y efectos adversos del cromo, en dos especies de rotíferos dulceacuícolas, Aguascalientes: s.n.

Herrera, J., Rodríguez, J., Coto, J. & Salgado, V., 2012. Evaluación de metales pesados en los sedimentos superficiales del río Pirro. *Tecnología en Marcha*, 26(1), pp. 27-36.

Hogendoor, A. S., Tenholder, J. H. & Stirk, J. T., 1988. The influence of pH on the toxicity of hexavalent chromium to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Pollutants-Transformation and Biological Effects; Proceedings of the Second International Symposium on Aquatic Pollutants.*, 1(1), p. 477–478.

Huang, Y. y otros, 2016. Removal of heavy metals from water using polyvinylamine by polymer-enhanced ultrafiltration and flocculation. *Separation and Purification Technology*, 158(1), pp. 124-136.

Idoniboye, O., B. 1997. Bioelectric action potentials of *Procambarus acutus acutus* (Girrad) in serially diluted solutions of select C6 hydrocarbons in water. *Environmental Pollution*, Issue 14, pp. 5-24.

Iannacone, J. & Gutiérrez, A. 1999. Ecotoxicidad de los agroquímicos lindano y clorpirilos sobre el nematodo *Panagrellus*, la microalga *Chlorella* y el ensayo con *Allium*. *Agricultura tecnológica* (Chile), Issue 59, pp. 85-94

Innacone, J., Alvarado, L. & Dale, W. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como herramientas para la evaluación del impacto ambiental. *Biology*, Lima (Perú), Issue 113, pp. 53-68.

Iqbal, M., 2016. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. *Chemosphere*, 144(1), pp. 785-802.

Jackson, M. B., 1988. The Dominant Attached Filamentous Algae of Lake Huron: Field Ecology and Biomonitoring Potential during 1980. *Hydrobiology*, 163(1), pp. 149-171.

Jara, J., 2014. *Jara Pets*. [En línea] Available at: <http://jarapetsblog.blogspot.mx/2014/08/artemia-de-agua-doce-branchonetas.html>

[Último acceso: 9 Diciembre 2015].

Jerónimo, M., F., Rodríguez, E. J. & Martínez, J., L. 2008. *Daphnia exilis* (Crustacea: Cladocera). Una especie zooplactonica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Revista internacional de contaminacion ambiental*. 24 (4), pp. 15-38

Katz, S. A. & Salem, H., 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation. *Journal of Applied Toxicology*, 13(3), pp. 217-224.

Kenyifish, A. D., 2015. *Kenyifish Aquarium Desing*. [En línea] Available at: <http://www.kenyifish.com.ar/artemia.html>

[Último acceso: 6 diciembre 2015].

Khwaja, A. R., 1998. *Studies on pollution abatement of wastes from leather*. s.l.:University of Roorkee.

Kiskun, G. C., Barmanland, S. C. & Bhargava, S. K., 2000. Contamination of Soil and Plants with Potentially Toxic Elements Irrigated with Mixed Industrial Effluent and its Impact on the Environment. *Journal of Water, Air, and Soil Pollution*, 120(1), pp. 121-137.

Kristen, U., 1997. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. *Toxicology in Vitro*, 11(2), p. 181–191.

Kwok, K. W. H. y otros, 2007. Comparison of tropical and temperate freshwater animal species acute sensitivities to chemicals : Implications for deriving safe extrapolation factors. *Environmental Toxicology Chemistry*, Issue 3, pp. 49-67.

Leme, D. M. & Marin, M. M. A., 2009. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), p. 71–81.

Lilus, E., J. 1995. *Análisis de Agua- Evaluación de la toxicidad aguda con Artemia franciscana Kellog (Crustacea-Anostraca)*. México. Tesis D.F.: s.n

Liu, K. & Shi, X., 2001. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 34(1), pp. 41-47.

Lou, Z., Wadhawan, A. & Bouwer, E. J., 2010. Sorption behavior of nine chromium (III) organic complexes in soil. *International Journal Environmental Science and Technology*, 7(1), pp. 1-10.

MacLachy, J., 1992. CEPA; PSL; Metal Data from Base Metal Smelters and. *Industrial Programs Branch, Environment Canada*, 28(1), pp. 2-37.

Mance, G., 1987. Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environment,. *Elsevier Applied Sciences*, 9(1), p. 372.

Mancera, R. N. J. & Alvarez, L. ., R., 2006. Current State of Knowledge of the Concentration of Mercury and Other Heavy Metals in Fresh Water Fish in Colombia. *Scielo*, 27 Enero, 11(1), pp. 4-5.

Marchese, M., Gagneten, A. M., Parma, M. J. & Pavé, P. J., 2008. Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(1), pp. 603-609.

Martinez, M. J., 2010. *BIOL. JESUS MARTINEZ MEZA*. [En línea] Available at: <http://jesusmartinez46.blogspot.mx/> [Último acceso: 4 Diciembre 2015].

Masscheleyn, P. H., Pardue, J., DeLaune, R. D. & Patrick W., H., 1992. Chromium Redox Chemistry in a Lower Mississippi Valley Bottomland Hardwood Wetland. *Environmental Science and Technology*, 26(1), pp. 1217-1226.

McLaughlin, J. L., Lingling, L. R. & Anderson, J. E., 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Journal Drug Information* , 32(1), pp. 513-524.

Meadows, D. H., Meadows, D. L. & Readers, J., 1992. *Mas Alla de los Limites del Crecimiento*. 1 ed. Madrid, España.: El pais.

Mechaly, A. S., Cervellini, P. M. & Bambill, G. A., 2004. Experiencias preliminares con *Artemia persimilis* (Crustacea, Anostraca) como potencial alimento vivo en acuicultura. *Revista AquaTIC*, Issue 21, pp. 1-7.

Melo, L. L., 2006. *Análisis y caracterización de ácidos fulvicos y su interaccion con algunos metales pesados.*, Pachuca de soto, Hidalgo.: s.n.

Miller, D. M., Buettner, G. R. & Aust, S. D., 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), pp. 95-108.

Mishra, A. K. & Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish *Channa punctatus* (Blonch). *Environmental toxicology and Pharmacology*, 26 (1), pp. 136-141.

Murray, J., Spell, B. & Paul, B., 1983. The Contrasting Geochemistry of Manganese and Chromium in the Eastern Tropical Pacific Ocean. In: Trace Metal in Seawater, NATO Conference Series 4. *Marine Science*., 13(1), pp. 643-669.

Neli, D., 2015. *Planeta Neli*. [En línea] Available at: <http://www.planeta-neli.es/index.php/2015/10/20/artemia-salina-parte-ii/>

[Último acceso: 29 Noviembre 2015].

Nieboer, E. & Jusys, A. A., 1988. Biologic Chemistry of Chromium. *Chromium in the Natural and Human Environments*, 17(1), pp. 21-79.

NOM-001-ECOL-1996, 1996. 1996, Mexico, D.F.: Diario Oficial de la Federacion.

NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, 2004. *Normas Oficiales Mexicanas*, Mexico, D.F.: Diario Oficial de la Federacion.

Nriagu, J. O., 1988. Production and Uses of Chromium. *Chromium in the Natural and Human Environments.*, 34(1), pp. 125-172.

Nriagu, J. O., 1990. Global Metal Pollution. *Poisoning the Biosphere. Environment*, 32(1), pp. 7-33.

Nunes, B. S., Carvalho, D. F., Guilhermino, M. L. & Van Stappen, G., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, Noviembre, Volumen 144, pp. 453-462.

Ohe, T., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(2), p. 109–149.

Ortuño, B. L., Sosa, U. R. & Giles, G. A., 2009. *Ejecución de bioensayos y asistencia en estudios de impacto ambiental.*, Mexico, D. F.: s.n.

Outridge, P. M. & Scheuhammer, A. M., 1993. Bioaccumulation and Toxicology of Chromium: Implications for Wildlife. *Environmental Contamination and Toxicology*, 130(1), pp. 31-77.

Oze, C., Bird, K. D. & S., F., 1974. Genesis of hexavalent chromium from natural sources in soil and groundwater. *National Academy of Sciences*, 104(16).

Palacios, F. M. R. y otros, 2003. Química de conchas de ostrácodos: una alternativa para medir la contaminación. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 20(2), pp. 139-153.

Panagoula, B., Panayioti, M. & Iliopoulou, G. J., 2002. Acute Toxicity of TBT and IRGAROL in *Artemia salina*. *Int. J. Toxicol.*, 1(12), pp. 231-233.

Papadopoulos, A., Lazaridou, E., Mauridou., G. & Touraki, M., 2004. Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. *Mar. Biol.*, 144(1), pp. 259-301.

Pereira, M. M., 2013. *Toxicidad del cromo trivalente sobre el alga verde Dictyosphaerium chlorelloides y su adaptación a ambientes acuáticos altamente contaminados con este estado de oxidación del metal pesado*, Madrid, España: UCM.

Perez-Legaspi, I., A. 2000. *Desarrollo de pruebas de toxicidad agudas y subcrónicas utilizando tres especies de rotíferos dulceacuícolas del género (Lecane, Rotífera, Monogononta)*. Tesis maestría. Centro de ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 79

Perez, P. O. & Lazo, J. F., 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), pp. 34-43.

Persoone, G., Van de Vell, A., Van Steetegem, M. & Nayer, B. 1989. *Predictive value for laboratory tests with aquatic invertebrates*. *Aquatic Toxicology*, Issue 14, pp. 149-156.

Pettine, M. & Millero, F. J., 1990. Chromium Speciation in Seawater: The Probable Role of Hydrogen Peroxide. *Limnology and Oceanography*, 35(1), pp. 730-736.

Pineros, R. G. P. & Quintero, F. J. A., 2008. *determinación de la concentración letal media (cl50) del glifosato roundup 747 sg ((NH₄)C₃H₇NO₅P), por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia pulex*, BOGOTÁ: s.n.

PNUMA, 1984. Cap. Problemas y esperanzas. En: Nairobi, ed. *Salvemos al Planeta*. Buenos Aires, Argentina.: PNUMA, pp. 567-605.

Ponce, V. G. & Vazquez, B. A., 1991. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Terminos, Campeche. *Hidrobiologica*, 1(2), pp. 1-10.

Putte, V. D., Brinkhorst, M. A. & Koeman, J. H., 1987. Effect of pH on the acute toxicity of hexavalent chromium to Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *AQUATIC TOXICOLOGY*, 2(1), pp. 129-142.

Rai, D., Eary, L. E. & Zachara, J. M., 1993. Environmental Chemistry of Chromium. *Science of The Total Environment*, 86(1), pp. 15-23.

Ramirez, R. P. & Mendoza, C. A., 2008. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. México, D.F.: Secretaría de medio ambiente y recursos naturales . Instituto Nacional de Ecología.

Rangel, C. A. A. & Maldonado, V. M., 2014. Cromo hexavalente en la industria: Repercusiones a la salud y medidas de control. *Revista Mexicana de Salud en el Trabajo.*, 6(16), pp. 77-84.

Reboleira, A. S., Abrantes, N., Oromí, P. & Gonçalves, P., 2013. Acute Toxicity of Copper Sulfate and Potassium Dichromate on Stygobiont *Proasellus*: General Aspects of Groundwater Ecotoxicology and Future Perspectives. *Water Air Soil Pollut*, 28 Marzo, 1(1), pp. 224-1550.

Reinhold, J. G., 1975. Trace elements a selective survey. *Clinical Chemistry.*, 21(1), pp. 476-500.

Rico-Martínez, R. ; Pérez, L., I., A. 2001. *Acute toxicity tests on three species of the Cladoceros. Hydrobiology*. 387 (388): 341-348

Rivera, R. N., 2013. *Comparación de seis dietas diferentes de microalgas locales para el crecimiento de Artemia*, LA PAZ, BCS.: s.n.

Rodriguez, R., 1998. *El uso de nauplios de Artemia franciscana en pruebas de toxicidad.*, La Habana, Cuba.: s.n.

Rodriguez, R. & Garcia, C. A., 2006. *Los Residuos minero-metalurgicos en el medio ambiente.* 11 ed. Madrid, España.: Publicaciones del Instituto geologico y minero de España. Serie: Medio ambiente.

Roldan, P. G., 1999. Los macroinvertebrados y su valor como indicadores de la calidad del agua. *Revista Academica Colombiana Cientifica.*, Septiembre, 23(88), pp. 375-387.

Rosemberg, D. & Resh, V., 1993. Freshwater. Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrate. Issue 420, pp. 330-354.

Ruiz, H. M., 2016. *Estudio del efecto toxico agudo del cromo hexavalente, ante variaciones de pH sobre zooplacton marino (Artemia franciscana)*, Morelia, Michoacán: UMSNH.

Saleh, F. Y. y otros, 1989. Kinetics of Chromium Transformations in the Environment. *Science of The Total Environment*, 86(1), pp. 25-41.

Sánchez-Fortún, S., Sanz-Barrera, F. & Barahona-Gomariz, M. V., 1995. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. *Bulletin of enviromental contamination and toxicology*, 1(54), pp. 76-82.

Scherehardt, A., 1987. Ultrastructural investigations of the filter-feeding apparatus and the alimentary canal of *Artemia*: 33-52. In: *Artemia research and its applications. Morphology, Genetics, Strain Characterisation, Toxicology*. Sorgeloos, P. Bengston, D.A, Decleir, W., Jaspers, E. (Eds), Volumen 1, p. 380.

Schinitman, N. I., 2004. *ECO PORTAL.NET*. [En línea] Available at: http://www.ecoport.net/Temas-Especiales/Contaminacion/Metales_Pesados_Ambiente_y_Salud [Último acceso: 19 Octubre 2015].

Sepúlveda, V. T., Velasco, T. J. & Pérez, D., 2005. *Suelos contaminados por metales y metaloides: Muestreo y alternativas para su remediación*. Mexico: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos naturales. Instituto Nacional de Ecología.

Services, D. o. H. a. H., 2012. *Toxicological Profile for Chromium*. Agency for Toxic Substances and Disease, Registry GA, USA.. [En línea] Available at: www.U.S Department of Health and Human Services.com [Último acceso: 12 Octubre 2015].

Silva, J., Torrejon, G., Bay Schmith, L. & Larin, A. 2003. Calibración de bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un toxico de referencia, *Gayana*.67 (1), pp. 87-96.

Shazili, N. & Pascoe, D., 1986. Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*., 36(1), pp. 468-474.

Shrivastava, R., Upreti, R., Seth, P. & Chaturvedi, U., 2002. Effects of chromium on the immune system. Biomembrane Division. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34(1), pp. 1-7.

Silva, P. A., 2011. *COMPRA.QUIMICA.COM Productos quimicos online*. [En línea] Available at: <http://www.compraquimica.com/sales-y-productods-quimicos-inorganicos/102-dicromato-de-potasio.html> [Último acceso: 2015 Noviembre 2015].

Sivakumar, S. & Subbhuraam, C. V., 2005. Toxicity of chromium(III) and chromium(VI) to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 62(1), pp. 8-93.

Solomon, F., 2008. Impacts of Metals on Aquatic Ecosystems and Human Health. *Enviroment and Communities*, 1(1), pp. 14-19].

Sorgeloos, P., 1980. Life history of the bride shrimp *Artemia*: p. xix-xxiii. In: The brine shrimp *Artemia*. *Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*. G. Persoone, O. Roels, E. Jaspers (Eds), 1(1), p. 345.

Sorgeloos, P., Bengtson, D. A., Declair, W. & Jaspers, E., 1987. *Artemia* research and its applications, Morphology, Genetics. Strain characterization. *Toxicology*, 1(1), p. 380.

Sorgeloos, P. y otros, 1986. *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture. Prepared for the Belgian Administration for Development Cooperation*, Belgica,: s.n.

Stoeppler, M., 1992. Chromium. In: Hazardous Metals in the Enviroment. *Elsevier Science Publishers*, Volumen 12, pp. 373-404.

Stouthart, A. J., Spanings, F. A., Lock, R. A. & Wendelaar, B. S., 1995. Effects of water pH on chromium toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 32(1), pp. 31-42.

Triantaphyllidis, G. V. A. T. J. & Sorgeloos, P., 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea Anostraca). *Journal Biogeography*, 25(1), pp. 213-226.

Triantaphyllidis, G. V. y otros, 1995. International study on *Artemia* XLIX. salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive, and lifespan characteristics of a bisexual *Artemia*. *Hydrobiologia*, 302(1), pp. 215-227.

UNAM, 2007. *Hoja de seguridad xiv. Dicromato de potasio*, Mexico, D.F.: s.n.

(UNEP), U.N.E.P. 1988. International Labour Organization (ILO), World Health Organization(WHO). [En línea] <http://www.unep.org/spanish/>

Valiela, I., 1995. *Marine ecological processes*. Segunda ed. Boston: Springer.

Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), pp. 1161-1208.

Valko, M. y otros, 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, Volumen 160, pp. 1-40.

Van Stappen, G., 1996. *Introduction, biology and ecology of Artemia*. In: Lavens, P.; Sorgeloos, P. (Eds)., s.l.: Fisheries Technical Paper.

Vanhaecke, P. & Persoone, G., 1984. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia* nauplii. Methodology and evaluation. *Ecotoxicological Testing for the Marine Environmental*, pp. 143-157.

Vanhaecke, P. & Sorgeloos, P., 1980. International study on *Artemia*. IV. The biometric of *Artemia* strains from different geographical origins. En: Persoone G, P Sorgeloos, O Roels, & E Jaspers (eds) *The Brine-Shrimp Artemia. Ecology, culture, and use in Aquaculture*, 3(1), pp. 393-405.

Van, H. F. & Van, S. M., 1998. Analysis of copper, zinc, cadmium, and chromium in fish tissues. A tool for detecting metal caused fish kills. *Chemosph*, 10(10), pp. 1127-1135.

Velandia, G. L. M., 2010. *Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del plomo y cromo hexavalente mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando Daphnia pulex*. Bogota: Universidad de la Salle.

Velandia, G. L. M. & Motañez, C. Y. S., 2010. *Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del plomo y cromo hexavalente mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando Daphnia pulex*, Bogota.: s.n.

Venkatramreddy, V., Vutukuru, S. S. & Tchounwou, B. P., 2009. Ecotoxicology of Hexavalent Chromium in Freshwater Fish: A Critical Review. *Revista Environmental Health.*, 24(2), pp. 129-145.

Vera, C. J. & Soloneski S., L. M. L., 2011. Acute toxicity of chromium *Cnesterodon desemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Theoria*, 20(1), pp. 81-88.

Vinardell, M. H. M. P., 2007. Experimentación con animales y bioética. *Acta Bioethica*, 13(1), pp. 7-71.

Vincent, J. B., 2000. Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes. *Nutrition*, 58(1), pp. 67-72.

Vutukuru, S. S., 2005. Acute Effects of Hexavalent Chromium on Survival, Oxygen Consumption, Hematological Parameters and Some Biochemical Profiles of the Indian Major Carp, *Labeo rohita*. *International Journal Environmental Research and Public Health*, 2(3), pp. 456-462.

Webber, M. D. & Shames, A., 1987. Heavy Metals Concentration in Halton Region Soils: An Assessment for Future Municipal Sludge Utilization. *Canadian Journal of Soil*, 67(1), pp. 893-903.

Wetterhahn, K., Tsapakos, M. & Hampton, T., 1983. Chromium (VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. *Cancer Research*, 47(1), pp. 5662-5667.

Williams, W. & Geddes, M. C., 1991. Anostracans of Australan Salt Lake, with particular reference to a comparison of *Parartemia* and *Artemia*. *Artemia Biology*, pp. 351-368.

Wise, D. y otros, 2000. *Bioremediation of Contaminated Soils*. Primera ed. New, York.: Marcel Dekker, Inc.