

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

“Determinación de la concentración de la inhibición media (CE_{50-96}) y el efecto fitotóxico del arseniato de sodio ($NaH_2AsO_4 \cdot H_2O$) en *Lactuca sativa* (lechuga) mediante bioensayos, en la Provincia de Tacna”

TESIS

Presentada por:

Bach. Silvia Yovana Huanca Arocutipa

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 276

TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por Resolución de Facultad N° 8499-2016-FACI-UN/JBG, el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la tesis:

“Determinación de la concentración de la inhibición media (CE_{50-96}) y el efecto fitotóxico del arseniato de sodio ($NaH_2AsO_4 \cdot H_2O$) en *Lactuca sativa* (lechuga) mediante bioensayos, en la Provincia de Tacna”

El mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
SECRETARIO : Mgr. Isabel Ancco Oliva
MIEMBRO : MSc. Angela Choque Miranda

Para examinar y calificar la sustentación de tesis en acto público el día 22 de junio del 2016, a las 9:30 horas; presentado por el Bachiller: **SILVIA YOVANA HUANCA AROCUTIPA**, de la Escuela Profesional de Biología - Microbiología.

Los miembros del Jurado Calificador, en forma secreta e individual emitieron su calificación sobre la tesis expuesta y procedió a emitir el siguiente resultado:

Aprobado por **UNANIMIDAD**, con el calificativo de 15 (QUINCE).

Para ratificar lo detallado firman:



Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
Presidente



Mgr. Isabel Ancco Oliva
Secretario



MSc. Angela Choque Miranda
Miembro

DEDICATORIA

A Dios

Por cuidarme y guiarme en cada paso de mi vida y haberme permitido llegar a culminar este trabajo, dándome la confianza y voluntad para seguir adelante.

A mis padres Ramón y Feliciano

Por su amor, comprensión y paciencia, brindándome su apoyo incondicional en todo momento a lo largo de toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de tener unos padres maravillosos, quienes me apoyaron en todo momento y por permitirme haber llegado a este momento de mi vida, tan importante para mi desarrollo profesional.

A mi asesor de tesis, Dr. César Julio Cáceda Quiroz, por su apoyo, tiempo, paciencia y guía durante el desarrollo y culminación del trabajo.

Al biólogo Miguel Ángel López Ruelas, por su colaboración, guía e importante apoyo en la parte estadística durante la realización de este estudio.

Al profesor Alfredo Quispe, Julio Gonzales, amigos y todas las personas que colaboraron y apoyaron en la realización de este trabajo.

A Héctor, por su apoyo, consejos y ánimos de aliento a seguir adelante a lo largo de este tiempo.

A mis profesores, quienes me guiaron en la senda del conocimiento

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enunciado del problema	4
1.2 Hipótesis	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Problema de arsénico en el Perú	6
2.2 Arsénico en Tacna	7
2.2.1 Ubicación	7
2.2.2 Problema de arsénico en Tacna	7
2.2.3 Límites admisibles de arsénico	11
2.3 <i>Lactuca sativa</i> (Lechuga)	13
2.3.1 Descripción	13
2.3.2 Posición taxonómica	13
2.3.3 Variedades	14
2.3.4 Morfología	15
2.4 Arsénico	16
2.4.1 Características generales	16
2.4.2 Toxicidad del arsénico	16
2.4.3 Arseniato de sodio	19
2.4.4 Mecanismo de acción	21
2.4.5 Excreción	21
2.4.6 Usos	22
2.5 Arsénico en el ambiente	23
2.6 Arsénico en la salud humana	24

2.7	Arsénico en el agua	24
2.8	Arsénico en alimentos.....	26
2.9	Arsénico en plantas	27
2.9.1	Absorción y transporte en las plantas	30
2.9.2	Translocación.....	31
2.10	Fitotoxicidad.....	31
2.11	Bioensayos	33
2.11.1	Importancia de bioensayos.....	34
2.11.2	Bioensayos en plantas	35
2.11.3	Bioensayos en semillas.....	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1	Materiales	46
3.1.1	Material biológico	46
3.1.2	Material de vidrio.....	46
3.1.3	Material de plástico	46
3.1.4	Reactivos	46
3.1.5	Equipos	46
3.1.6	Otros	47
3.1.7	Lugar de experimentación.....	47
3.2	Métodos.....	47
3.2.1	Diseño experimental	47
3.2.2	Variables	49
3.2.3	Obtención de semillas.....	49
3.2.4	Preparación de solución patrón.....	49
3.2.5	Bioensayo preliminar.....	50
3.2.6	Bioensayo definitivo de toxicidad	50
3.2.7	Protocolo de ensayo de toxicidad aguda	51
3.2.8	Análisis estadístico.....	55

IV. RESULTADOS.....	56
4.1 Bioensayo preliminar	56
4.2 Bioensayo definitivo	63
4.2.1 Determinación de la concentración de inhibición media (CE ₅₀₋₉₆) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en la germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i>	63
4.2.2 Determinación de la concentración de inhibición media (CE ₅₀₋₉₆) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en el crecimiento de la radícula en semillas de <i>Lactuca sativa</i>	69
4.2.3 Determinar la concentración de inhibición media (CE ₅₀₋₉₆) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en el crecimiento del hipocótilo en semillas de <i>Lactuca sativa</i>	75
4.2.4 Efectos fitotóxicos del arseniato de sodio	81
V. DISCUSIÓN	87
VI. CONCLUSIONES	99
VII. RECOMENDACIONES	101
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
IX. ANEXOS	109

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1.- Análisis de varianza para longitud de radícula de <i>Lactuca sativa</i> sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.....	56
Tabla 2.- Prueba de Dunnett para longitud de la radícula de <i>Lactuca sativa</i> sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.	57
Tabla 3.- Análisis de varianza para longitud del hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.	59
Tabla 4.- Prueba de Dunnett para longitud del hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.	60
Tabla 5.- Resultados de inhibición (%) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.	62
Tabla 6.- Resultados de germinación (%) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	63
Tabla 7.- Análisis de varianza para germinación de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.....	65
Tabla 8.- Prueba de Dunnett para porcentaje de germinación de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	66
Tabla 9.- Germinación promedio e inhibición de semillas de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.....	67
Tabla 10.- Resultados de longitud de radícula (mm) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	69
Tabla 11.- Análisis de varianza para longitud de radícula de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	71
Tabla 12.- Prueba de Dunnett para longitud de radícula de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	72

Tabla 13.- Crecimiento promedio e inhibición de crecimiento de radícula de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	73
Tabla 14.- Resultados de longitud del hipocótilo (mm) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	75
Tabla 15.- Análisis de varianza para longitud del hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	77
Tabla 16.- Prueba de Dunnett para longitud del hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	78
Tabla 17.- Longitud promedio e inhibición de crecimiento del hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	79
Tabla 18.- Cuadro comparativo de los efectos fitotóxicos de la exposición del arseniato de sodio en <i>Lactuca sativa</i> (lechuga).	85
Tabla 19.- Peso molecular del $\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	115

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1.- Longitud de radícula (mm) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.....	58
Figura 2.- Longitud del hipocótilo (mm) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.....	61
Figura 3.- Resultados de germinación (%) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.	64
Figura 4.- Estimación de la concentración de inhibición media (CE ₅₀₋₉₆) de la germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> sometida al arseniato de sodio.....	68
Figura 5.- Longitud de radícula (mm) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.....	70
Figura 6.- Estimación de la concentración de inhibición media (CE ₅₀₋₉₆) del crecimiento de radícula de <i>Lactuca sativa</i> sometida al arseniato de sodio.	74
Figura 7.- Longitud del hipocótilo (mm) de <i>Lactuca sativa</i> sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.....	76
Figura 8.- Estimación de la concentración de inhibición media (CE ₅₀₋₉₆) del crecimiento del hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> sometida al arseniato de sodio.....	80

CONTENIDO DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.-** Porcentaje de germinación promedio de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio, respecto al control..... 81
- Gráfico 2.-** Crecimiento promedio del crecimiento de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio..... 83

CONTENIDO DE ANEXOS

- ANEXO 1.-** Glosario..... 109
- ANEXO 2.-** Principales especies arsenicales detectadas en muestras biológicas y/o medioambientales. 114
- ANEXO 3.-** Preparación de la solución patrón de arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). 115
- ANEXO 4.-** Preparación de las diluciones con arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). 116
- ANEXO 5.-** Protocolo de ensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* (lechuga). 117
- ANEXO 6.-** Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de exposición y parámetros a medir 118
- ANEXO 7.-** Germinación y estadios de desarrollo por los que atraviesa la semilla y la plántula de *Lactuca sativa* (lechuga) durante el ensayo de toxicidad. 118

ANEXO 8.- Promedio de concentraciones de arsénico de los monitores de calidad de aguas superficiales, emitido por la Autoridad Nacional el Agua del 2011 al 2014 en cuencas de la ciudad de Tacna.....	119
ANEXO 9.- Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para el agua en sus categorías en los dos últimos Decretos Supremos 2008 y 2015.....	120
ANEXO 10.- Imágenes de semillas de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) germinadas con concentraciones de arseniato de sodio, observadas en Laboratorio.....	122
ANEXO 11.- Observación de la fitotoxicidad del arseniato de sodio en <i>L. sativa</i> (lechuga).	130
ANEXO 12.- Medición de radícula e hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga).	131
ANEXO 13.- Resultado del porcentaje de germinación de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) en promedio, sometidas a tratamientos (concentraciones de arseniato de sodio).	132
ANEXO 14.- Resultado del crecimiento de la radícula e hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga) en promedio, sometidas a tratamientos (concentraciones de arseniato de sodio). ..	134
ANEXO 15.- Interpolación para determinar la concentración de inhibición media (CE ₅₀₋₉₆).....	136
ANEXO 16.- Formato de recolección de datos de la medición realizadas a la radícula e hipocotilo de <i>Lactuca sativa</i> (lechuga).	138

RESUMEN

El presente trabajo de investigación busca determinar el efecto que causa el arsénico (As) en concentraciones elevadas, teniendo como referencia que las fuentes de aguas superficiales de Tacna superan los límites permisibles, cuyo objetivo fue determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y el efecto fitotóxico del arsénico en *Lactuca sativa* (lechuga) mediante bioensayos, haciendo uso del compuesto arseniato de sodio ($NaH_2AsO_4 \cdot H_2O$) para la experimentación.

La realización de bioensayos se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna. Donde el experimento se desarrolló en condiciones de laboratorio mediante una prueba estática de toxicidad aguda (por 96 horas de exposición), con un diseño completamente al azar (DCA), un análisis de varianza (ANOVA) y el uso de la prueba de Dunnett. El bioensayo se desarrolló siguiendo el protocolo empleado por Castillo (2004), que constó de un bioensayo preliminar y ensayo definitivo. Donde para el ensayo preliminar se sometieron a 5 concentraciones de arseniato de sodio (0,01 %; 0,1 %; 1,0 %; 10 % y 100 %) además de un control (testigo) con 3 repeticiones por tratamiento, con un total de 18 placas de Petri con 20 semillas cada una, haciendo un total de 360 semillas. Mientras que para el ensayo definitivo se sometió a 6 tratamientos (concentraciones de 0,1 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L; 100 mg/L y 150 mg/L), además de un control (testigo), con 6 repeticiones, con un total de 42 placas de Petri, con 20 semillas en cada una, haciendo un total de 840 semillas. Evaluándose el porcentaje de inhibición, crecimiento de la radícula e hipocótilo respecto al control.

Determinándose que la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) del arseniato de sodio en la germinación de *Lactuca sativa* (lechuga) fue de 16,72 mg/L, la CE_{50-96} para el crecimiento de la radícula fue de 0,96 mg/L, mientras que la CE_{50-96} para el crecimiento del hipocótilo fue de 4,1 mg/L. Así mismo, se establecieron síntomas de fitotoxicidad, inhibición en la germinación y crecimiento de *Lactuca sativa*, reducción de la elongación radicular o del hipocótilo, ausencia de pelos absorbentes, reducción de ensortijamiento, clorosis en hojas y necrosis en distintas áreas de la plántula, en los tratamientos (concentraciones de As) (Tabla 18). Se encontró que a mayor concentración de arsénico, mayor será el efecto tóxico en vegetales.

Palabras clave: Concentración de inhibición media, arseniato de sodio, *Lactuca sativa*, bioensayos, radícula, hipocótilo.

I. INTRODUCCIÓN

La presencia de arsénico en el ambiente es un problema de salud pública debido a que se trata de un evento de alta frecuencia, detectado en distintos países, tal es el caso de Canadá, Estados Unidos, Chile, Bolivia, México, el Salvador y el Perú.

El arsénico es un metal pesado, altamente tóxico, siendo las formas inorgánicas más tóxicas que las orgánicas, presentes en el suelo, aire y agua, siendo este último la mayor amenaza en la salud pública como resultado de la ingestión prolongada de arsénico inorgánico en el agua (OMS, 2006). El consumo de agua con As conlleva a efectos crónicos, porque se ingieren pequeñas cantidades en el agua a largo plazo, pudiendo ocasionar alteraciones en la piel con efectos secundarios en el sistema nervioso, irritación de los órganos del aparato respiratorio, gastrointestinal y acumulación en los huesos, músculos, piel, hígado y riñones (Carro, Francisca, y Cebollada, 2007), llegando a manifestarse el arsenismo en un periodo de cinco a 20 años (OMS, 2006), por lo que la OMS ha llegado a la conclusión de que uno de cada 10 000 habitantes corre el riesgo de adquirir cáncer de piel debido a la ingestión diaria de agua con concentraciones de 0,222 mg/L.

La zona sur del Perú es caracterizada por una actividad volcánica importante, propia del círculo de fuego del Pacífico, por lo que las concentraciones de arsénico en el agua de consumo son elevadas, ya sea por razones geogénicas o antropogénicas (Franco, Ponce, y Rodríguez, 2012). La zona alto andina de Tacna presenta una actividad volcánica, producto de ella, existe en forma natural la presencia de afloramientos

hidrotermales que tienen elevadas temperaturas y alto contenido de sales de boro y arsénico, por lo que las aguas superficiales en las cuencas de Tacna presentan concentraciones elevadas de arsénico (Rivas, Aguirre, y Salas, 2002), superando considerablemente los límites permisibles establecidos por los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua establecidos por el Ministerio del Ambiente (MINAM) (ANEXO 9) en la categoría 3 (para riego de vegetales y bebida de animales), reportando hasta concentraciones de 0,7978 mg/L en la cuenca Locumba, en los últimos monitoreos del ANA (ANEXO 8).

Teniendo en cuenta que aunque el agua es la principal vía de entrada en la cadena alimentaria humana, también el consumo de alimentos contaminados de origen vegetal y animal puede ser otra vía importante de captación (Mayorga, 2011). De esta forma la población está expuesta a la contaminación de As a través de la ingesta de alimentos, considerando que la acumulación de metales pesados puede acarrear, a la larga consecuencias negativas para el entorno ecológico, afecta al 12 % de las tierras agrícolas del mundo (Atencio, 2013).

Dado que las hortalizas se ven expuestas al As a través del agua de riego o por captación del suelo y que los vegetales son fundamentales en la dieta del hombre, la acumulación de metales pesados en tejidos vegetales puede llegar a producir daños genotóxicos en las células, de esta forma a través de la cadena alimenticia e ingesta de alimentos de origen animal y vegetal ingresan al hombre, constituyendo un riesgo permanente para la salud en distintos sectores de la población, quienes hacen uso de las fuentes hídricas, cuencas de Tacna, es de importancia el estudio del As en el agua

y el efecto de éste en los cultivos, por estar en concentraciones que superan los límites permisibles establecidos por los ECA en su categoría 3.

Pues si bien las entidades responsables proporcionan los parámetros físico-químicos, no hay una demostración biológica de los efectos tóxicos que causan los metales pesados en organismos expuestos, por lo que se busca contribuir aportando conocimiento sobre el efecto que causa el arsénico (en forma de arseniato de sodio) a elevadas concentraciones, en fuentes de aguas superficiales que superan los límites permisibles, sobre cultivos regados por estas aguas, estableciendo los efectos tóxicos que causan en su desarrollo (germinación y crecimiento), así como su fitotoxicidad en cultivos, mediante bioensayos de toxicidad haciendo uso de *Lactuca sativa* (lechuga), como un representante hortícola, tanto por su sensibilidad a diferentes tipos de contaminantes (metales, pesticidas y otros compuestos), como por su simplicidad en la ejecución del bioensayo (Sobrero, 2010); siendo este bioensayo de toxicidad recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental, como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), para la evaluación de muestras ambientales y compuestos puros (OECD, 1984; Wang, W. 1987; USEPA, 1989; Boutin y cols., 1993, citado en Castillo, 2004).

1.1 Enunciado del problema

¿Cuál es la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y el efecto fitotóxico del arseniato de sodio en *Lactuca sativa*?

1.2 Hipótesis

Las elevadas concentraciones de arsénico causan inhibición y efectos fitotóxicos en *Lactuca sativa*.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en la germinación y crecimiento en semillas de *Lactuca sativa*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en la germinación de semillas de *Lactuca sativa*.
- Determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en el crecimiento de la radícula en semillas de *Lactuca sativa*.
- Determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en el crecimiento del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa*.

- Establecer los efectos fitotóxicos de la exposición del arseniato de sodio en *Lactuca Sativa*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Problema de arsénico en el Perú

La presencia natural de arsénico en aguas superficiales y subterráneas de América Latina está asociada al volcanismo terciario y cuaternario desarrollado en la Cordillera de Los Andes, proceso que aún continúa y que se muestra en flujos de lava, géiseres, fumarolas, aguas termales y fenómenos geotérmicos relacionados con el volcanismo circumpacífico del llamado “Círculo de fuego del Pacífico” (Castro de Esparza, 2006).

En el Perú, su presencia en el ambiente y en las fuentes de agua para consumo humano se debe a factores naturales de origen geológico y actividades antropogénicas que involucran la explotación minera y refinación de metales por fundición, la población más afectada es la que se encuentra dispersa en el área rural, que en la mayoría de los casos consumen agua de fuentes sin ningún tratamiento, desconociendo el riesgo al que están expuestos (Pérez, 2013).

La zona sur del Perú quien con alteraciones de orden natural, debido a la actividad volcánica, propia del círculo del Pacífico, las aguas y suelos de los alrededores de estas fuentes, se encuentran en concentraciones elevadas de As (Valencia, 2009); esta zona es la cabecera del desierto de Atacama, lo cual la caracteriza como una zona de estrés hídrico, específicamente, el departamento de Tacna que colinda con Chile, tiene una provisión de agua insatisfecha y agricultura limitada por la sobreexplotación de sus aguas, principalmente subterráneas (Franco, Ponce, y Rodríguez, 2012).

2.2 Arsénico en Tacna

2.2.1 Ubicación

La región Tacna se ubica en la parte sur occidental de América del Sur, en el extremo sur del Perú, a 1 348 km² de Lima; en la cabecera del desierto de Atacama, el segundo desierto más grande del mundo. La extensión territorial de la Región Tacna es de 16 075,89 km², entre las coordenadas 16°58' y 18°20' de latitud sur y 69°28' y 71°02' de longitud oeste. Limita por el noroeste con el departamento de Moquegua, por el norte con Puno, por el este con la República de Bolivia, por el sur con la República de Chile y por el oeste con el Océano Pacífico (Franco, Ponce, y Rodríguez, 2012).

2.2.2 Problema de arsénico en Tacna

De acuerdo a los reportes de análisis físico-químicos de distintas entidades a la fecha, los recursos hídricos de la ciudad de Tacna muestran la presencia de elementos contaminantes, debido al producto de la actividad volcánica en la zona alto andina de la región, existiendo la presencia de afloramientos hidrotermales que tienen elevadas temperaturas y alto contenido de sales, como el boro, hierro y principalmente arsénico (Franco, Ponce, y Rodríguez, 2012), dificultando el aprovechamiento de recursos hídricos en sus distintas cuencas. Así mismo, existen áreas semidesérticas cuya población bebe agua de los ríos que se originan en los Andes y que fluyen hacia el Océano Pacífico, usando estas

aguas contaminadas para riego de vegetales, bebida de animales y consumo de la población rural.

En la cuenca del río Locumba se observa la presencia de afloramientos hidrotermales en dos zonas específicas, una de ellas emplazada en la subcuenca del río Callazas y que es proveniente de la actividad del volcán Tutupaca y otra zona emplazada en la subcuenca del río Salado, específicamente en la zona de Calientes y proviene de la actividad del volcán Yucamani y alrededores (INRENA-DGAS, 2002).

En la cuenca del río Sama, la fuente de contaminación de boro y arsénico proviene de la subcuenca del río Salado, específicamente del sector de Ichicollo la misma que proviene de la actividad de los aparatos volcánicos, sin embargo, esta cuenca del río Sama presenta también contaminación de hierro la que proviene exclusivamente de la subcuenca del río Aruma y el foco de contaminación natural se ubica en las nacientes del río Tarucachi en la cordillera del Barroso (INRENA-DGAS, 2002).

En la cuenca del río Maure la contaminación de boro y arsénico también proviene de la actividad volcánica, los afloramientos hidrotermales se emplazan en tres sectores principales: zona Putina, zona de Calachaca y zona de Kallapuma las mismas que contaminan el río Maure.

En la cuenca Caplina, las fuentes hídricas presentan también dos fuentes de contaminación, las cuales presentan contaminación de hierro en sus nacientes.

El canal Uchusuma que proviene de la derivación de los recursos hídricos de la zona el Ayro, presentan contaminación de boro y arsénico provenientes de la actividad volcánica que existe aguas arriba de la represa Paucarani (INRENA-DGAS, 2002).

Comparando los niveles de arsénico en el agua con los límites permisibles de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua, que establecen el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo, en su condición de cuerpo receptor, que no representen riesgo significativo para la salud de las personas ni al ambiente. Señalan que los recursos hídricos en los puntos principales de aprovechamiento de cada una de las cuencas mencionadas, presentan valores por encima de los límites máximos permisibles, dado por la legislación peruana en su último Decreto Supremo del MINAM, donde los ECA - 2015 las concentraciones permisibles asumieron valores, dos veces mayor al de los ECA - 2008, en su categoría 3 (ANEXO 9).

El Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM (ECA, 2008), señalaron que para el arsénico en su categoría 3, para riego

de vegetales de tallo bajo y tallo alto no debe de exceder de 0,05 mg/L; para bebida de animales no debe de exceder de 0,1 mg/L y en su categoría 4, para Conservación de Ríos (costa y sierra) no debe de exceder de 0,05 mg/L.

El Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM (ECA-2015), en su última modificación, señala nuevas concentraciones para el arsénico, en su categoría 3, D1: Riego de vegetales de tallo corto y tallo alto no debe de exceder de 0,1 mg/L; para D2: Bebida de animales no debe de exceder de 0,2 mg/L y en su categoría 4, para E2: Conservación de Ríos (costa y sierra) no debe de exceder de 0,15 mg/L.

De acuerdo a los reportes de análisis físico-químicos y tomando como base los datos registrados por la “Autoridad Nacional de Agua” (ANA), en los últimos años las concentraciones de Arsénico en las cuencas de Tacna, sobrepasan los límites permisibles, dando un énfasis a las de Locumba y Sama (ANEXO 8).

ANA (2011), reportó concentraciones de arsénico en el monitoreo realizado en las cuencas: Locumba, Sama, Caplina y Uchusuma con concentraciones elevadas de arsénico de 0,7978 mg/L; 0,6527 mg/L; 0,2975 mg/L; 0,1657 mg/L establecidas en promedio respectivamente para cada cuenca en el año.

ANA (2012), reportó concentraciones de arsénico en los monitoreos realizados en las cuencas: Locumba, Sama, Caplina y Uchusuma con concentraciones elevadas de arsénico de 0,4776 mg/L; 0,4991 mg/L; 0,13 mg/L; 0,1176 mg/L establecidas en promedio respectivamente para cada cuenca en el año.

ANA (2013), reportó concentraciones de arsénico en los monitoreos realizados en las cuencas: Locumba, Sama, Caplina y Uchusuma con concentraciones elevadas de arsénico de 0,4277 mg/L; 0,4389 mg/L; 0,066 mg/L; 0,0961 mg/L establecidas en promedio respectivamente para cada cuenca en el año.

ANA (2014), reportó concentraciones de arsénico en los monitoreos realizados en las cuencas: Locumba, Sama, con concentraciones elevadas de arsénico de 0,4912 mg/L, 0,5483 mg/L, establecidas en promedio respectivamente para cada cuenca en el año.

2.2.3 Límites admisibles de arsénico

DIRESA (2011) estableció una norma local, donde el límite máximo permisible para consumo de agua es de 0,05 mg/L, para aquellas aguas que provienen de fuentes geotermales (República, 2013).

OMS (2006), señala que la presencia de arsénico no debe sobrepasar concentraciones mayores a 0,01 mg/L en aguas de consumo humano.

EPA (2006), coincide con la OMS con un límite máximo de arsénico de 0,01 mg/L para consumo humano (Carro, Francisca, y Cebollada, 2007).

USEPA (1990), clasifica al arsénico como cancerígeno, determina un nivel máximo permisible de arsénico para consumo humano de 0,05 mg/L.

La FAO (1985), establece una concentración de 0,1 mg/L de arsénico en aguas destinadas al riego.

El manual de Evaluación y Manejo de Sustancias Tóxicas en Aguas Superficiales del Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (**CEPIS**), establece el mismo valor que formula la FAO, para el arsénico.

La Comunidad Económica Europea (**CEE**), establece una concentración máxima de 0,05 mg/L (Vazquez, Ortolani, Rizzo, Bachur, y Pidustwa, s.f).

En el Perú, el último Decreto Supremo **Nº 015-2015-MINAM**, establece una concentración para el arsénico de 0,1 mg/L, para aguas destinadas al riego tomando como base la FAO.

2.3 *Lactuca sativa* (Lechuga)

2.3.1 Descripción

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una planta anual y autógena, propia de las regiones templadas, que se cultiva con fines alimentarios. Debido a las muchas variedades que existen, y a su cultivo cada vez mayor en invernaderos, se puede consumir durante todo el año. Normalmente se come cruda, como ingrediente de ensaladas y otros platos, pero ciertas variedades, sobre todo las de origen chino, poseen una textura más robusta y por ello se emplean cocidas (Pérez, y Baracaldo, 2010).

2.3.2 Posición taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Lactuca*

Nombre científico: *Lactuca sativa*

Nombre Común: Lechuga

Fuente: Barrios, 2004

2.3.3 Variedades

Presenta una gran cantidad de variedades botánicas, entre las que destacan (Krarup y Moreira, 1998, citado en Morales y Blanco, 2011):

- *Lactuca sativa L. var. Capitata (L.) Janchen*: corresponde a las lechugas conocidas como de amarra (porque antiguamente se amarraban para blanquear sus hojas internas) mantecosas o españolas.
- *Lactuca sativa L. var. Crispa L.*: corresponde a las lechugas de cabeza, *Great Lakes* o *Batavias*, mal llamadas escarolas en Chile.
- *Lactuca sativa L. var. Longifolia (Lam.) Janchen*: corresponde a las lechugas llamadas romanas o cos, conocidas en Chile específicamente como costinas.
- *Lactuca sativa L. var. Acephala Dill*: corresponde a las lechugas de cortar, de corte o de hojas sueltas (“loose leaf”), ya que como su nombre lo indica, este tipo no forma cogollo, sino que sus hojas se presentan sueltas, no envolventes.
- *Lactuca sativa L. var. Augustuana All*: corresponde a la llamada lechuga espárrago o de tallo. En este tipo se utiliza principalmente el tallo, que es carnoso, y también las hojas, que pueden presentar color verde o rojizo (Pérez, y Baracaldo, 2010).

2.3.4 Morfología

- **Raíz:** Se desarrolla durante la germinación de la semilla, que no llega nunca a sobrepasar los 25 cm de profundidad, es pivotante, corta y con ramificaciones.
- **Hojas:** Órgano de las plantas especializado en la fotosíntesis que crece en las ramas o el tallo, generalmente de color verde, ligera, plana y delgada, que puede tener diversas formas dependiendo de la especie, el borde de los limbos puede ser liso, ondulado o aserrado. Las hojas están colocadas en roseta, desplegadas al principio; en unos casos siguen así durante todo su desarrollo (variedades romanas), y en otros se acogollan más tarde.
- **Tallo:** Este tiene una formación cilíndrica y ramificada de poca longitud.
- **Inflorescencia:** Son capítulos florales amarillos dispuestos en racimos o corimbos.
- **Semillas:** Tiene forma abovada, achatada, con 3 a 5 costillas en la cara; de color blanco, amarillo, marrón o negro, mide unos 2 a 4 mm de longitud. En su base se encuentra el “vilano” o “papus” plumoso que facilita la diseminación por el viento, este se desprende fácilmente quedando el arquenio-semilla limpio (Morales y Blanco, 2011).

2.4 Arsénico

2.4.1 Características generales

El arsénico es un metaloide que ocupa el vigésimo lugar de abundancia en la corteza terrestre, es un elemento ubicuo en la atmosfera, en el ambiente acuático y terrestre, acumulado por los animales y vegetales (Elika, 2013). Se presenta en forma combinada con otros elementos, en más de 200 compuestos diferentes (Thomton y Farago, 1998, citado en Ponce, Farías, Vélez, y Montoro, 2006). Existen en cuatro estados de valencia como: arsina (As^{3-}), arsénico metaloide (As^0), arsenito (As^{3+}) y arsenato (As^{5+}). En el ANEXO 2 se muestran las estructuras químicas de las especies arsenicales más comunes en alimentos y muestras biológicas.

2.4.2 Toxicidad del arsénico

El grado de toxicidad del arsénico depende básicamente de su forma, inorgánica u orgánica (presentes en el agua y suelo) y de su estado de oxidación, y dentro de éstos, hay dos tipos de compuestos diferentes para cada uno (Abedin, Feldman, y Meharg, 2002, citado en Carro, Francisca, y Cebollada, 2007):

- Inorgánico:
 - Arsenito As (III)
 - Arsenato As (V)
- Orgánico
 - Ácido Dimetilarsénico (DMA)
 - Ácido Monometilarsénico (MMA)

Las formas inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas, el As inorgánico puede dañar el ADN; mientras que el As orgánico es menos peligroso (Elika, 2013 y Valencia, 2009), los compuestos de arsénico trivalente (arsenitos) son más tóxicos que los pentavalentes (arseniatos) (OMS, 2001), siendo la toxicidad del As^{+3} 10 veces mayor que la del As^{+5} , y la dosis letal para adultos es de 1 - 4 mg/kg de As (Castro de Esparza, 2006), así mismo, la exposición alta de ciertos compuestos orgánicos de arsénico puede causar efectos similares a los causados por arsénico inorgánico.

Carro, Francisca, y Cebollada (2007), indican que la escala de toxicidad decrece en el siguiente orden:

Arsina > As^{+3} inorgánico > As^{+3} orgánico > As^{+5} inorgánico > As^{+5} orgánico > compuestos arsenicales y arsénico elemental.

Arsénico inorgánico:

El arsénico pertenece al grupo V y las principales valencias que el elemento presenta en la naturaleza son -3, +3 y +5. La Organización Mundial de la Salud (OMS), el departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) han determinado que el arsénico inorgánico es cancerígeno en seres humanos (IARC - Grupo 1) por existir suficiente evidencia epidemiológica de que induce diferentes tipos de cánceres, como de piel, vejiga y pulmón, aunque con escasa evidencia para cáncer de riñón, hígado y próstata. Los seres humanos absorben rápidamente el As inorgánico a través de la dieta, se distribuye por todos los órganos y, atraviesa la barra placentaria, metabolizándose a forma orgánica para ser excretado. El arsénico inorgánico biodisponible produce toxicidad aguda, y dosis altas provocan síntomas gastrointestinales, trastornos de las funciones de los sistemas cardiovascular, nervioso y en último término la muerte (Prieto, González, Román, y Prieto, 2009).

Arsénico orgánico:

El arsénico está presente en numerosos compuestos de carácter orgánico, debido a la elevada estabilidad del enlace carbono-arsénico bajo las condiciones medioambientales normales (pH y potencial redox). El As orgánico ingerido, principalmente a través de los pescados y mariscos, se absorbe en un 70 % y es excretado rápidamente por la orina.

2.4.3 Arseniato de sodio

El arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) es un compuesto inorgánico, sólido, incoloro y altamente tóxico, perteneciente a la familia de los compuestos arsenicales inorgánicos; es bastante frecuente confundirlo con el arsenito de sodio, pero no es el mismo compuesto; los compuestos arsenicales inorgánicos son clasificados como oncogénicos.

El arsénico pentavalente (As^{+5}) genera aniones con una configuración análoga al anión fosfato, y causa desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, estimulación de la actividad de la ATPasa mitocondrial e inhibición de la NAD reductasa. El As^{+5} se convierte en As^{+3} en los sistemas biológicos animales, siendo este último de 2 - 10 veces más tóxico que el As^{+5} (Zaman y Pardini, 1996, citado en Lannacone, Alvariño, y Paredes, 2009). En general, la forma pentavalente del arsénico (V) tiende a predominar frente a la forma trivalente (III) en las aguas superficiales, más oxigenadas que las aguas subterráneas.

El arseniato sería el estado de oxidación predominante o más estable en medios oxigenados, con el H_2AsO_4^- predominando bajo condiciones ácidas y el $(\text{HAsO}_4)^{-2}$ predominando bajo condiciones alcalinas (Carbonell, Burló, y Mataix, 1995).

La producción, importación, comercialización y uso del arseniato como agentes plaguicidas, razones sanitarias o uso domiciliario quedan prohibidos en distintos países, así por

ejemplo en Argentina compuestos como el arseniato de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , según la Resolución MSN 456/2009 queda prohibida su venta (Departamento de Salud Ambiental, 2012).

2.4.3.1 Absorción

El arseniato es análogo al fosfato y se absorben por el mismo sistema de transportadores, el arseniato sustituye al fosfato en la síntesis de ATP y en varias reacciones de fosforilación, interfiriendo de esta forma en el metabolismo del fosfato. La sensibilidad al arseniato es dependiente de la nutrición de fósforo, de forma que un incremento de los niveles de fosfato en planta puede dar lugar a una reducción de la absorción de arseniato mediante la supresión del sistema de alta afinidad fosfato/arseniato.

Se ha descubierto en plantas de arroz, que el transporte de arsenito se produce a través de una familia de acuoporinas que son permeables al arsenito, pero no al arseniato, las acuoporinas transportan moléculas neutras, como agua, glicerol y urea. Según su localización y homología se clasifican en cuatro subfamilias, siendo una de ellas las proteínas intrínsecas de membrana (NIP). El arsenito, con un pKa igual a 9,22, se presenta como molécula sin carga de ácido arsenioso a pH inferior a 8,0. El descubrimiento de un transportador *NIP* en raíz para el ácido silícico, que tampoco posee carga a pH 8,0 y cuyo tamaño

molecular es similar al del ácido arsenioso, conduce a la hipótesis de que el arsenito se transporte mediado por transportadores del ácido silícico (Esteban y cols., 2003; Ma y cols., 2008, citado en Manzano, 2013).

2.4.4 Mecanismo de acción

El As^{+5} con excepción del arsénico elemental es fácilmente absorbido a través de la piel, los pulmones y el tracto digestivo (Pérez, 2013), distribuido en el cuerpo como complejo de proteína (α -globulina) - arsénico, es un tóxico protoplasmático que se une a los grupos sulfhidrilo, inhibiendo a varias enzimas, especialmente del metabolismo celular y las de la respiración, éste posee un efecto de dilatación y aumento de la permeabilidad capilar del intestino; aunque este metal se encuentre en los tejidos en pequeñas cantidades, no tiene función fisiológica (Carrión, 2009). En el agua de bebida, el arsénico se encuentra en la forma de arsenato y puede ser absorbido con facilidad en el tracto gastrointestinal en una proporción entre 40 y 100 % (Castro de Esparza, 2006).

2.4.5 Excreción

La excreción del arsénico absorbido se realiza principalmente por la orina y una pequeña cantidad en las heces, también se excreta en leche materna, uñas, cabellos y bilis; la excreción tiene lugar en 3 fases, con vidas medias de alrededor de 24 h, 84 h y 8 días, respectivamente (Carrión, 2009). La proporción relativa de As^{+3} , As^{+5} , MMA y DMA en la orina

puede variar dependiendo de la forma administrada, tiempo después de la exposición, vía de exposición y cantidad de dosis; en general el DMA es el principal metabolito con niveles más bajos de arsénico inorgánico (As^{+3} y As^{+5}) y MMA; en los humanos la proporción relativa usualmente es 40 % a 60 % de DMA, 20 % a 25 % de arsénico inorgánico y 15 % a 25 % de MMA (Pérez, 2013).

2.4.6 Usos

El As fue usado como medicamento, el trióxido de arsénico fue usado con fines terapéuticos, la solución de Fowler (arsenito de potasio al 1 %) fue usada para aliviar diversas enfermedades como: anemia, reumatismo, psoriasis, asma, cólera, para tratar el acné y como agente quimioterapéutico para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica junto con la irradiación, hasta 1953; la arsenamina fue usada como clave en el tratamiento de la sífilis por más de 40 años. Los arsenicales orgánicos fueron utilizados para el tratamiento de enfermedades tal como la tripanosomiasis africana “enfermedad africana del sueño”. En China se utilizaron concentraciones micromolares de trióxido de arsénico para combatir la leucemia promielocítica aguda. Así mismo, las sales de arsénico son empleadas en la fabricación de pigmentos, rodenticidas, fungicidas e insecticidas, en la fabricación de vidrio, pigmentos, aditivos de metal, municiones, preservantes de alimentos, en la industria textil y en la manufactura del papel, pero actualmente existen restricciones para su uso.

Uno de sus usos actuales es como parte de componentes electrónicos (WHO, 2001), en el tratamiento de la madera como arseniato de cromo y cobre, un porcentaje menor en productos químicos para la agricultura, otro pequeño porcentaje en la fabricación de vidrios, productos farmacéuticos y aleaciones no ferrosas, etc. (Rodríguez y Echevarría, 2008). Sin embargo, los compuestos arsenicales provocan reacciones no deseadas y por eso siempre, a través de la historia, se intentó reemplazarlos por compuestos menos tóxicos (Galetovic y De Fernicola, 2003).

2.5 Arsénico en el ambiente

El arsénico no puede ser destruido en el ambiente, solamente pueden cambiar de forma, adherirse o separarse de partículas; está presente en el suelo, aire y fuentes de agua captadas para consumo. El arsénico se encuentra en el ambiente principalmente como arsenito y arseniato (WHO, 2001, citado en Galetovic y De Fernicola, 2003); el arsenito será oxidado en la mayoría de los suelos agrícolas a arseniato (Carbonell, Burló, y Mataix, 1995).

Las principales fuentes de As son por factores naturales de origen geológico en América Latina (Argentina, Chile, México, Perú), así como a actividades antropogénicas que involucran la explotación minera, refinación de metales por fundición de metales no ferrosos, la quema de combustible fósil (Bolivia, Chile y Perú), procesos electrolíticos de producción de metales de alta calidad como cadmio y cinc (Brasil), y en menor proporción en la agricultura el empleo de

plaguicidas arsenicales orgánicos (México), esas partículas son dispersadas por el viento y retornan a la tierra por deposición seca o húmeda (Castro de Esparza, 2006 y Galetovic y De Fernicola, 2003), siendo el agua la principal vía de dispersión del arsénico en el ambiente, distribuyéndose ampliamente por el medio ambiente (Carbonell, Burló, y Mataix, 1995).

2.6 Arsénico en la salud humana

Las principales vías de exposición para el hombre son el aire, el consumo de agua y alimentos; el arsénico en los alimentos se encuentra en forma orgánica e inorgánica, con distinta toxicidad (Ponce y cols., 2006). Son numerosas las poblaciones afectadas en todo el mundo, donde el As y sus compuestos son clasificados por la Agencia Internacional de Estudios del Cáncer (IARC) como Grupo I o cancerígenos para el ser humano (Carro, Francisca, y Cebollada, 2007). La intoxicación por arsénico (arsenicismo) se manifiesta de forma característica a lo largo de un periodo de cinco a 20 años (OMS, 2006).

2.7 Arsénico en el agua

En el agua, el arsénico se encuentra en sus estados trivalentes (arsenitos) y pentavalentes (arseniato), dependiendo del potencial de reducción de los mismos (Vázquez, Ortolani, Rizzo, Bachur, y Pidustwa, 2000). El As (V) prevalece en aguas superficiales; en agua de bebida el As se encuentra en forma de arseniato, siendo fácilmente absorbida por el tracto gastrointestinal, por lo que la mayor amenaza

a la salud pública proviene del agua como resultado de la ingestión prolongada arsénico inorgánico en el agua (OMS, 2006).

El consumo de agua con arsénico no conlleva a casos con efectos agudos, sino más bien crónicos, porque se ingieren pequeñas cantidades en el agua a largo plazo (Castro de Esparza, 2006). La ingestión, a largo plazo por exposición crónica y a ciertas concentraciones puede ocasionar alteraciones en la piel con efectos secundarios en el sistema nervioso, irritación de los órganos del aparato respiratorio y gastrointestinal, acumulación en los huesos, músculos, piel, hígado y riñones (Carro, Francisca, y Cebollada, 2007), teniendo una relación causal con un aumento de los riesgos de cáncer de piel, de pulmón, de vejiga y de riñón, así como con otros cambios cutáneos (Prieto y cols., 2009), progresivamente la enfermedad evoluciona produciendo la hiperqueratosis palmoplantar con pigmentación de la piel, callosidades en las palmas de manos y pies, con lesiones dolorosas que impiden caminar y realizar tareas manuales, melanodermia del tronco y parte superior de los miembros y cancerización (Carro, Francisca, y Cebollada, 2007).

La ingestión de agua con arsénico puede llevar a un incremento de abortos espontáneos y de recién nacidos muertos, una exposición prolongada a concentraciones de arsénico inorgánico fuera del valor sugerido por la OMS en el agua de bebida puede causar efectos cardiovasculares, incluyendo arritmias, hipertensión, isquemia cardíaca y cerebral, diabetes mellitus y alteraciones arteriales periféricas como la enfermedad del “pie negro” que resulta en gangrena. Los estudios sobre el potencial neurotóxico y desarrollo de

efectos reproductivos adversos asociados con la ingestión de arsénico en el agua de bebida son inconclusivos (Buchet, Lison, 2000, citado en Galetovic y De Fernicola, 2003).

La OMS ha llegado a la conclusión de que uno de cada 10 000 habitantes corre el riesgo de adquirir cáncer de piel debido a la ingestión diaria de agua con concentraciones de 0,222 mg/L, siendo 0,0105 mg/L la dosis de arsénico que un ser humano puede ingerir por día, una persona de 70 kg (Batsheba, 1996; Díaz, 1999, citado en Prieto, Callejas, Lechuga, Gaytán, y Barrado, 2005).

2.8 Arsénico en alimentos

Aunque el agua es la principal vía de entrada en la cadena alimentaria también el consumo de alimentos contaminados de origen vegetal y animal son otra vía importante de captación (Mayorga, 2011), los seres humanos se exponen cuando se alimentan de los vegetales cultivados en suelos contaminados con arsénico, así como de alimentos derivados de animales que hayan ingerido arsénico presente en el suelo o en el agua (Elika, 2013). El arsénico se encuentra omnipresente en los alimentos, ya que cantidades mínimas del mismo se incorporan por contaminación.

Según la OMS el consumo humano diario no debe exceder los 0,025 - 0,040 mg/kg, pues una ingestión mayor llevaría a la acumulación de estos metales en órganos como el hígado y riñones, que pueden afectar su funcionamiento (Barragán, 2008), de esta forma la población está expuesta a la contaminación a través de la ingesta de alimentos constituyendo un importante factor de riesgo para la salud

de la población y los sistemas naturales. La cantidad total de arsénico ingerida por el hombre, depende de la cantidad de dichos alimentos en su dieta, pudiéndose alcanzar contenidos máximos de hasta 40 µg/g (Cervera, 1990, citado en Carbonell, Burló, y Mataix ,1995).

El arsénico en animales como de origen marino muestran contenidos de contaminante más altos que el resto y tienen la capacidad de metabolizar el arsénico inorgánico acumulándolo en forma de dimetilarsénico (compuesto orgánico); en los organismos vegetales, que por el contrario, son capaces de transformar el arsénico orgánico en inorgánico (Elika, 2013).

2.9 Arsénico en plantas

Las plantas absorben arsénico muy fácilmente, por este hecho, pueden estar presentes en los alimentos con un alto contenido (Valencia, 2009). La acumulación de As en tejidos vegetales puede llegar a producir daños genotóxicos en las células y de esta forma, se incorporan al hombre a través de la cadena alimenticia, siendo un importante contaminador de cultivos (Prieto, Vargas, Méndez, Barrado, y Gaytán, 2006).

La acumulación de metales pesados en tejidos vegetales son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes cultivos por absorción u otras formas de asociación natural dando la posibilidad de ser biodisponibles a los seres humanos y animales a través del consumo de estos productos (Ruíz y Armienta, 2012). Las concentraciones habituales de As en vegetales varían entre 0,08 y 2 mg/kg (Warren y Alloway, 2003), el límite máximo permitido para el

contenido de As en frutas y vegetales informado por Mitchell y Barr (1995) es de 1,0 mg/kg en peso fresco; en algunos casos, niveles de arsénico tan bajos como de 0,7 mg/kg pueden reducir el rendimiento de los cultivos en 50 % (Peterson y Girling, 1980).

Las plantas han desarrollado mecanismos muy específicos para absorber, translocar y acumular nutrientes; sin embargo, algunos metales y metaloides aunque no son esenciales para los vegetales son absorbidos, translocados y acumulados debido a que presentan un comportamiento electroquímico similar a los elementos nutritivos esenciales (Souza y cols., 2005, citado en Ruiz y Armienta, 2012).

La contaminación por metales pesados afecta al 12 % de las tierras agrícolas del mundo (Vargas, Martínez, Ortiz, y López, 2007); otros investigadores (Prieto, Callejas, Román, y Méndez, 2010) determinaron la bioacumulación de arsénico en órganos y tejidos de la cebada maltera (*Hordeum distichon* L.), encontraron una acumulación en diferentes etapas de desarrollo, encontrándose en la raíz una mayor concentración de arsénico acumulada (100 y 300 mg/kg), seguida por las hojas (80 a 180 mg/kg) y el tallo (70 a 110 mg/kg), y la acumulación de arsénico observado en granos (órgano comestible) resultó ser relativamente alto (40 - 90 mg/kg), concluyéndose un alto nivel de acumulación de arsénico.

Prieto, Callejas, Lechuga, Gaytán, y Barrado (2005), en su estudio de acumulación de arsénico en tejidos vegetales de la región de Zimapán - México, con aguas y suelos con altos contenidos de As natural, determinaron niveles de As por absorción atómica en

muestras de vegetales, mostrándose mayor capacidad de acumulación de As en la hojas, caso del perejil con 10,73 mg/kg de As en sus hojas, el epazote con 12,39 mg/kg de As en sus hojas, y encontrándose valores promedios de la concentración de As en hortalizas cultivadas como: *Lactuca sativa* (lechuga) hoja < 0,018 mg/kg de As, *Brassica Oleraceae* (col) hoja < 0,018 mg/kg de As, *Beta vulgaris* (acelga) hoja < 0,018 mg/kg de As, entre otras.

Carrión (2009) realizó un análisis de arsénico en tres alimentos: papas (*Solum tuberosum*), maíz (*Zea mays*) y leche cruda, producidas en las zonas afectadas por el volcán Tugurahua (Guano-Penipe) en Riobamba - Ecuador, de cultivos muestreados, y analizados por espectrometría de absorción atómica, encontrando concentraciones de As de los alimentos en los 2 sectores: en la papa de 0,03915 mg/kg y 0,03511 mg/kg de As; en el maíz: 0,03080 mg/kg y 0,02713 mg/kg de As y en la leche 0,03575 mg/L y 0,04467 mg/L de As, existiendo un grado de acumulación de arsénico en dichos alimentos, así mismo: Barragán (2008) en su estudio encontró niveles de concentraciones altas de As absorbidas por plantas de 0,116 a 0,199 mg/kg.

La exposición al arsénico inorgánico a través de la cadena de los alimentos es limitada, pero se justifica que se realicen más investigaciones sobre la absorción de arsénico por los cultivos regados con agua muy contaminada por éste. Así mismo, se desconocen todavía el mecanismo de la carcinogenicidad y la respuesta a niveles bajos de ingesta (OMS, 2006).

2.9.1 Absorción y transporte en las plantas

La captación de arsénico es mayor en las raíces, que las semillas y los frutos, su entrada en la planta es por absorción vía radicular, de forma análoga a como entran los nutrientes u otros elementos traza. Las raíces de las plantas poseen mecanismos tanto activos como pasivos de entrada de elementos minerales, por lo que su tasa de absorción estará gobernada por mecanismos fisiológicos que son determinantes para la supervivencia de la planta. Sin embargo, los mecanismos de homeostasis son imperfectos y la entrada de elementos en concentraciones tóxicas puede producirse si éstos se encuentran en el suelo en cantidad suficiente, para mantener la homeostasis de los elementos en rangos que las permitan la supervivencia, las plantas han desarrollado mecanismos de regulación de la absorción de elementos traza, que comprenden mecanismos de distribución, redistribución, almacenamiento, detoxificación cruciales (Verkleij y cols., 2009, citado en Moreno, 2010).

Los elementos contaminantes son absorbidos por la planta y translocados vía xilemática (apoplasto) junto con el agua y nutrientes hacia los sitios fotosintéticamente activos (hojas); es probable que por esta circunstancia se presente mayor acumulación de As en estos sitios ya que la translocación hacia los vertederos (frutos y raíces) presenta mayores barreras metabólicas (Gonzales, 1994). Los residuos más altos de arsénico se encuentran en las raíces de plantas (por ejemplo remolacha y rábano), con valores intermedios en las

partes altas vegetativas (espinacas e hierbas), y las semillas comestibles y los frutos contienen los niveles más bajos de arsénico (Woolson, 1973a; Walsh y Keeney, 1975, citado en Carbonell, Burló, y Mataix, 1995).

2.9.2 Translocación

Una vez que el arsénico ya ha sido absorbido por la planta, los compuestos de dicho elemento (particularmente el arsénico pentavalente) fluyen a través de la planta en pocas horas, moviéndose tanto simplásticamente (transporte activo de citoplasma a citoplasma) como apoplásticamente (transporte extracelular).

Los pasos a seguir por los citados compuestos cuando son absorbidos por la raíz:

Raíz → xilema → hojas → floema; hojas → floema → raíces, parte aérea, xilema.

El transporte de arsenito desde las raíces está limitado por su alta toxicidad para las membranas rediculares. El arseniato es más rápidamente absorbido y translocado, debido a su menor toxicidad para las raíces (Carrión, 2009).

2.10 Fitotoxicidad

La fitotoxicidad es la acumulación de sustancias dañinas en el tejido de una planta en niveles que afectan su crecimiento y normal desarrollo, existiendo distintos síntomas y niveles de daño por

acumulación de sustancias tóxicas o factores medioambientales. La fitotoxicidad del arsénico viene determinada por la forma química presente, el arsenito es más fitotóxico que el arseniato y ambos son mucho más fitotóxicos que el metanoarsoniato monosódico (MSMA) y el ácido cacodílico (CA); si los arsenicales son aplicados foliarmente, entonces, el CA es el más fitotóxico. Los diferentes compuestos varían en su disponibilidad y por tanto, en su toxicidad; siendo el arsénico soluble en agua más fitotóxico que otros más fuertemente enlazados (Carrión, 2009); los compuestos orgánicos de arsénico son aplicados en proporciones considerablemente más bajas que los inorgánicos, resultando menos fitotóxicos para los cultivos (Carbonell, Burló, y Mataix ,1995). La fitotoxicidad es dependiente de la sensibilidad del cultivo, así pues, el arsénico total del suelo no refleja adecuadamente la forma en que es disponible el elemento para la planta o su grado de toxicidad (Carbonell , Burló,y Mataix ,1995).

La presencia de arsénico dentro de las células vegetales tiene efectos fisiológicos negativos para la planta que originan una serie de respuestas (síntomas de toxicidad). La fitotoxicidad ocasionada por las altas concentraciones de metales pesados da como resultado clorosis, crecimiento débil de las plantas y puede incluso ocasionar reducción en la captación de los nutrientes así como desórdenes en el metabolismo, así lo demostró: Ruiz y Armienta, (2012) quienes en plantas de maíz sembradas con concentraciones de arsénico mostraron síntomas como: necrosis, clorosis, adelgazamiento de las hojas e inhibición del crecimiento.

Las plantas son mucho más resistentes a los incrementos en la concentración que a una insuficiencia de un elemento esencial dado; distinto es el caso de un elemento no esencial, donde el nivel de daño aumenta conforme lo hace el elemento. Los metales pesados causan estrés oxidante en las plantas que afectan la fotosíntesis, la fluorescencia de la clorofila y la resistencia estomatal; por ejemplo, el cobre inhibe la fotosíntesis y los procesos reproductores, el plomo reduce la producción de clorofila mientras que el arsénico interfiere con el proceso metabólico y disminuye la germinación de las semillas, consecuentemente, el crecimiento de las plantas se reduce o es total (Monni y cols., 2001; Fayiga y cols., 2004; y Hernández y cols., 2010, citado en Ruiz y Armienta, 2012).

2.11 Bioensayos

Los bioensayos, también llamados pruebas de toxicidad, son definidos como el método o herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre un organismo vivo, a través de comparaciones de este agente con el efecto de una solución patrón o estándar, bajo condiciones experimentales específicas y controladas; estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, cuyo objetivo principal es caracterizar la relación concentración-respuesta del agente. Los bioensayos permiten determinar los efectos tóxicos de una sustancia, su repercusión en una población y su medio ambiente. Estas pruebas se han desarrollado y estandarizado por agencias internacionales de protección ambiental.

Para la realización de una prueba de toxicidad se involucra un agente o estímulo (pesticidas, metales pesados o una muestras ambientales con contaminantes), el cual se aplica a un grupo de organismos (cultivo bacterial, algas, animales o plantas) (Castillo, 2004).

2.11.1 Importancia de bioensayos:

Los bioensayos de toxicidad constituyen un mecanismo para evaluar la calidad de aguas superficiales y son útiles para una variedad de propósitos que incluyen determinaciones de: (a) susceptibilidad de condiciones ambientales para la vida acuática; (b) factores ambientales favorables o desfavorables, como: oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura, salinidad, o turbidez; (c) efectos de factores ambientales en la toxicidad de aguas residuales; (d) toxicidad de agua residual para una especie; (e) sensibilidad de organismos acuáticos a efluente o tóxico; (f) cantidad y tipo de tratamiento residual necesario para conocer los requerimientos de control de la contaminación en agua; (g) eficacia de métodos de tratamientos de aguas residuales; (h) radio de descarga permisible de efluentes; y (i) cumplimiento con los estándares de calidad de agua, requerimientos de efluentes, y descargas permitidas (EPA, 2002, citado en Atencio, 2013). El uso de ensayos biológicos es considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de contaminantes (Cáceda, 2006).

Es importante determinar el nivel de riesgo ambiental de los metales pesados sobre diversos representantes del

ecosistema terrestre utilizando bioensayos; entre ellos, las plantas presentan diferentes especies representativas de los agroecosistemas hortícolas (Lannacone y Gutiérrez, 1999, citado en Prieto y cols., 2009).

2.11.2 Bioensayos en plantas

Los vegetales juegan un rol fundamental, tanto en los ecosistemas acuáticos como terrestres, por su importancia en la productividad primaria, en la cadena alimenticia, en el reciclado de nutrientes, además de proporcionar alimento y hábitat para otros organismos.

En distintos países se tienen algunas experiencias con el empleo de las plantas en la evaluación de la toxicidad de sustancias tóxicas y muestras ambientales. Como parte integral del ecosistema, las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser semillas eucarióticas, y por lo tanto, más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores; constituyen una eficiente herramienta en el orden ambiental, además de poseer las siguientes ventajas:

- Las plantas son más sensibles al estrés ambiental que otros sistemas de ensayos disponibles.
- Fácil manipulación y almacenaje.
- Bajo costo.
- Buena correlación con otros sistemas de pruebas.

Las plantas vasculares han sido recomendadas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2002) y por la administración de medicamentos y alimentos (FDA, 1990), ambas de EE.UU., ya que presentan una eficiente sensibilidad, en comparación con otras especies de plantas terrestres y debido a su buena sensibilidad, en comparación con semillas de otras especies de plantas terrestres (Wang, 1991, citado en Sánchez y Sánchez, 2009).

El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie; en las últimas décadas se han desarrollado bioensayos rápidos con el empleo de plantas, como semillas de prueba, las que funcionan como buenas herramientas de trabajo para el monitoreo ambiental (Sobrero, 2010).

La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta; de esta manera la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores sub-letales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información (Díaz, Bustos, y Espinosa, 2004, citado en Castillo, 2004).

2.11.3 Bioensayos en semillas

El ensayo ecotoxicológico con semillas de plantas vasculares presenta algunas ventajas sobre otras especies terrestres, lo que permite usar cuantitativamente el crecimiento de la raíz; es ventajoso, por requerir poco volumen de muestra (1 ml envase), comparado con otros organismos que requieren de 50 a 200 ml envase (Arambasic et al., 1995, citado en Prieto y cols., 2009). La evaluación de la toxicidad de contaminantes utilizando semillas indica una amplia variedad en la respuesta a los metales.

El bioensayo con semillas es el más indicado para estimar el daño en especies terrestres de la flora riparia y evaluar la probabilidad de desarrollo de las plántulas en un medio con contaminantes, además de la permitir la exposición tanto a muestras líquidas (compuestos puros, muestras de aguas superficiales, efluentes, lixiviados) como sólidas (suelo sedimentos) (Sobrero, 2010). Siendo importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto, una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Díaz, Bustos, y Espinosa, 2004, citado en Sánchez y Sánchez, 2009); por lo que la justificación para realizar este bioensayo radica en la importancia de eventos de desarrollo temprano en el crecimiento y supervivencia de las plantas.

Wang (1991), indicó que el crecimiento de raíz como punto final de lectura, es más sensible a la toxicidad que la germinación de semillas, la cual presenta un alto coeficiente de variación. Calow (1993) presentó un resumen de los protocolos de bioensayos de germinación de semilla y de elongación de raíz con diferentes especies de plantas, siendo comparables al protocolo usado en este estudio (Prieto y cols., 2009).

A diferencia del bioensayo tradicional de germinación de las semillas, que evalúa la emergencia de la plántula del suelo (USEPA, 1989; ASTM, 1991a), la evaluación del efecto en la prolongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas permite la evaluación del efecto tóxico de compuestos solubles presentes en concentraciones tan bajas que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sí pueden retardar o inhibir completamente los procesos de prolongación de la raíz o del hipocótilo, lo que depende del modo y sitio de acción de los contaminantes generados para cada uno de los medios expuestos en los ensayos fitotóxicos. Este bioensayo puede ser ejecutado con cualquier número de especies, las cuales resulten económicamente importantes, sean fácilmente disponibles, germinen y crezcan rápidamente; siendo una de las semillas más comúnmente utilizadas en esta prueba la de *Lactuca sativa* (lechuga) por su grado de sensibilidad.

2.11.3.1 Bioensayos en semillas de *Lactuca sativa*

El bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición), en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas sobre el proceso de germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento, descrito por (Castillo, 2004).

El ensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa*, ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales, compuestos puros y para la evaluación del efecto fitotóxicos de pesticidas sobre especies no blanco necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984b, Wang, 1987; USEPA, 1989; Boutin et al., 1993). Donde se utilizan semillas de *Lactuca sativa*, por su rápida germinación, facilidad de medición y viabilidad económica, además de las ventajas mencionadas a continuación por (Sánchez y Sánchez, 2009):

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

- No requiere equipamiento sofisticado.
- Utilidad para el control de efluentes.

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, ni tampoco es una especie nativa o naturalizada en nuestros ambientes, la información generada a partir de este ensayo de toxicidad proporciona datos sobre el posible efecto de los contaminantes sobre las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola (Castillo, 2004).

Estos ensayos pueden ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1989; Dutka, 1989), encontrándose bioensayos toxicológicos con diversos compuestos y organismos de pruebas, a nivel nacional e internacional entre ellos:

- A nivel nacional algunos trabajos fueron de la Universidad Nacional Agraria La Molina, en el año 2004 se realizó un estudio sobre los efectos de los

Plaguicidas Metamidofos y Carbofuran sobre alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus Mykiss*), este trabajo se desarrolló en el Centro Piscícola “El Ingenio”, Provincia de Concepción en Perú.

- En el año 2006 se realizó una investigación para conocer el efecto ecotoxicológico, en tres niveles de dureza total de agua, del dodecil benceno sulfonato de sodio (DBSS) y del alquil aril sulfonato de sodio (AASS), ingredientes activos principales de dos detergentes comerciales biodegradables, en el Centro de Producción “El Ingenio”, Huancayo - Perú, empleando la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) como herramienta para la evaluación de riesgo ambiental.
- Atencio (2013) determinó la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆) y efecto hisopatológico del sulfato de cobre mediante bioensayos con alevinos del “carachi amarillo” *Orestias luteus*, encontrando una concentración Letal Media (CL₅₀₋₉₆) de 1,65 µg/l y afectando al pez en la estructura ocular, una atrofia celular del cristalino y el iris en la concentración de 20 µg/l, lo mismo en la estructura del iris a 10 µg/l en comparación con el control.
- Cáceda (2006) realizó la aplicación de bioensayos para evaluar el efecto tóxico de metales pesados de

fuentes superficiales de agua para consumo humano en la ciudad de Tacna - Perú, de muestras de agua del río Santa sobre el crecimiento de la raíz de *Allium cepa* y *Lactuca sativa*, en condiciones controladas de laboratorio, empleando serie de concentraciones y haciendo uso de un control, se determinó que la CL₅₀ del cromo a 1,5 mg/L inhibe el 50 % de la raíz, y a concentraciones mayores de 2,5 % disminuye la mitosis de las células meristemáticas de *A. cepa*, así mismo, el plomo en concentraciones mayores a 0,06 mg/L inhibe en 50 % (IC) el crecimiento de la raíz y el 50 % de las mitosis de las células meristemáticas de *A. cepa*, indicando que el Cr y el Pb, a dichas concentraciones no influyen en la germinación de *L. sativa*.

- Ponce, Cabana, Vaira, y Giunta (2007), en la universidad de Chile, realizaron un estudio para determinar la toxicidad y la bioactividad de alcaloides totales extraídos de *Coronopus dydimus* (L.) mediante bioensayos dichos estudios de toxicidad aguda se realizaron con lombrices *Eisenia andrei* y los ensayos para bioactividad con *Artemia salina*. Encontrándose que la mezcla de alcaloides obtenida a partir de *Coronopus dydimus* se determinó una DL₅₀ = 3,498 mg/ml para *Eisenia andrei* a los 7 días de iniciado el ensayo,

clasificándose toxicológicamente como “moderadamente tóxica” con tendencia hacia la clasificación “no tóxica”; y se determinó una $CE_{50} = 773,69$ ppm para *Artemia salina* a las 24 horas de iniciada la prueba. Así mismo:

- En Chile, Gaete y Chavéz (2008) realizaron una evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (organismos de prueba para bioensayos de toxicidad), en condiciones experimentales y controladas, resultando que el arsénico fue el más tóxico, seguido de cobre y luego el zinc. El arsénico resultó ser 16 veces más tóxico que el zinc y cerca de 3 veces más tóxico que el cobre.
- En Bogotá, la universidad de la Salle, desde el año 2007, ha venido realizando proyectos de grado que involucran bioensayos con organismos acuáticos, haciéndose evidente el aporte a este tipo de investigación, han realizado trabajos de grado utilizando bioensayos con pulgas acuáticas, peces y semillas, más específicamente con *Daphnia magna*, *D. pulex*, *Oncorhynchus mykiss*, alevinos de trucha arco iris y *Lactuca sativa* (Morales y Blanco, 2011).

- Sánchez y Sánchez (2009) determinaron la concentración de inhibición media (CE_{50-120}) del bario, hierro y manganeso mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) en condiciones controladas con un tiempo de germinación de 120 horas, haciendo uso de compuestos como cloruro ferroso, cloruro de bario, óxido de manganeso, los resultados obtenidos se analizaron utilizando un método paramétrico para el cálculo de los valores de $CE_{(50-120)}$ para la germinación y su intervalo de confianza, donde se establecieron los valores de: bario (1,2630 mg/L), hierro (2,001 mg/L) y Mn (21,781 mg/L).

- Pérez y Baracaldo (2010) buscaron determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-120}) producida por la plata (Ag^+) y los detergentes aniónicos (LAS) mediante bioensayos de toxicidad sobre semillas de lechuga, donde la (CE_{50-120}) para compuestos puros de la Plata (Ag^+) y el detergente aniónico (LAS) sobre la especie de semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) fue de 85,6 y 111,5 ppm respectivamente.

- Morales y Blanco (2011) en su trabajo determinaron la concentración de inhibición media (CI_{50-120}) del molibdeno y el litio en semillas de lechuga (*Lactuca*

sativa L.) mediante ensayos de toxicidad, haciendo uso de compuestos, determinándose para el trióxido de molibdeno un efecto toxico no letal, por no modificar el porcentaje en la germinación de semillas, más se encontró un crecimiento favorable en la elongación de la radícula e hipocótilo, pero que es afectada a medida que aumenta la concentración; para el cloruro de litio se encontró una concentración de inhibición media (CI₅₀₋₁₂₀) de 74,0125 ppm.

- Duarte (2011), estudió los efectos fitotóxicos que puede generar los vertimientos de una empresa galvánica, específicamente los vertimiento de cobre y de níquel frente a un organismo como *Lactuca sativa*, determinando la CE₅₀ haciendo uso de compuestos, encontrando una concentración de inhibición media (CE₅₀) para el cobre (4,119 mg/L) y el níquel (7,511mg/L) .

Las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) pueden ser bioindicadores de contaminación de fuentes de agua y como bioindicador de exposición de arsénico, por lo que se sugiere la determinación de la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) y efecto fitotóxico del arsénico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

- Semillas de *Lactuca sativa*, variedad *Great lakes*

3.1.2 Material de vidrio

- Fiolas
- Vasos precipitado
- Pipetas
- Frasco ámbar
- Frascos de vidrio

3.1.3 Material de plástico

- Placas de Petri
- Pipeteador

3.1.4 Reactivos

- Arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Agua desionizada

3.1.5 Equipos

- Estereoscopio
- Balanza analítica
- Incubadora
- Refrigeradora
- Termómetro
- Autoclave
- Cámara fotográfica

3.1.6 Otros

- Papel filtro N°3 S/h, equivalente a Whatman N°3
- Vernier
- Pinzas, tijeras
- Bolsas plásticas
- Papel Kraft
- Guantes
- Mascarilla
- Pabilo

3.1.7 Lugar de experimentación

El presente trabajo experimental con bioensayos se realizó en el Laboratorio de Química Analítica (para la elaboración de la solución patrón); el Laboratorio de Microbiología (para las diluciones de los tratamientos) en la Facultad de Ciencias; y el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (para la realización de bioensayos) en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna.

3.2 Método

3.2.1 Diseño experimental, Montgomery (2004)

El bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) es una prueba de estática de toxicidad aguda (96 a 120 horas de exposición), se desarrolló bajo condiciones de laboratorio, y fue del tipo experimental, constó de un bioensayo preliminar con 5 tratamientos (concentraciones) de arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), además de un control sin adición de sustancia alguna, el número de repeticiones por

tratamiento fue de 3, con 20 semillas cada una, haciendo un total de 18 unidades experimentales (placas de Petri), trabajando con 360 semillas para el bioensayo preliminar, y un ensayo definitivo, con 6 tratamientos (concentraciones) de arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), además de un control sin adición de sustancia alguna; el número de repeticiones por tratamiento fue de 6, con 20 semillas cada una, haciendo un total de 42 unidades experimentales (placas de Petri), trabajando con en un total de 840 semillas de *Lactuca sativa* para el bioensayo definitivo de toxicidad, y así determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y la fitotoxicidad del arsénico. Ambos bioensayos bajo el diseño completamente al azar (DCA) y como sigue:

Tratamientos:

- T1: Grupo sometidos a concentración 1.
- T2: Grupo sometidos a concentración 2.
- T3: Grupo sometidos a concentración 3.
- T4: Grupo sometidos a concentración 4.
- T5: Grupo sometidos a concentración 5.
- T6: Grupo sometidos a concentración 6.
- C : Grupo control, sin tratamiento.

3.2.2 Variables

3.2.2.1 Variable independiente:

- Concentración del Arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

3.2.2.2 Variable dependiente:

- Germinación e Inhibición de semillas de *Lactuca sativa*
- Efectos fitotóxicos

3.2.3 Obtención de semillas

Las semillas de *L. sativa* (lechuga) se obtuvieron de una semillería local “Agrovic jj Torres”, semillas certificadas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas); con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocótilo. Se seleccionaron semillas del mismo tamaño.

3.2.4 Preparación de solución patrón

Para poder determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}), se procedió a preparar una solución patrón haciendo uso del compuesto: Arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) con 99,9 % de pureza, suministrado por “Delta química S.R.L.” en Arequipa. Así mismo, se utilizó el agua desionizada “VISTONY” para las diluciones y obtener las concentraciones deseadas.

Para el cual se preparó una solución patrón de 500 ml de 2000 mg/L o ppm de arsénico en un frasco ámbar, del cual se realizó las diluciones correspondientes para el bioensayo preliminar y ensayo definitivo de la experimentación (ANEXO 3).

3.2.5 Bioensayo preliminar

Con el fin de conocer el rango de las concentraciones a utilizar en el bioensayo definitivo, se realizó un bioensayo preliminar, en el cual grupos de 20 semillas fueron expuestos a diluciones de arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), incrementándose gradualmente las concentraciones en porción geométrica de 0,01 %; 0,1 %; 1,0 %; 10 % y 100 %, estableciéndose con esto un intervalo de concentraciones relativamente grandes según lo recomienda Castillo, (2004) de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre 0 y 100 %. De acuerdo a los resultados de este ensayo preliminar se ajustaron las concentraciones de la dosis (ANEXO 4).

3.2.6 Bioensayo definitivo de toxicidad

A partir de los resultados de los ensayos preliminares, se realizaron exposiciones definitivas, ajustando el intervalo de concentraciones utilizadas con cada metal de acuerdo a la sensibilidad, para evaluar los efectos fitotóxicos del $\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en *Lactuca sativa* (lechuga).

Las semillas fueron expuestas a concentraciones de arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), se prepararon diluciones de 0,1

mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L; 100 mg/L y 150 mg/L en fiolas con ayuda de micropipetas para mayor precisión en las diluciones (ANEXO 4), una vez obtenida las concentraciones stock se procedió a seguir el protocolo de bioensayo (Castillo, 2004), para determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) del arseniato de sodio.

3.2.7 Protocolo de ensayo de toxicidad aguda por (Castillo, 2004):

- Con ayuda de pinzas se colocaron en cada placa de Petri un disco de papel de filtro N°3 S/h - Munktell - Alemán, equivalente al papel filtro Whatman N°3, como medio de soporte y medio de inhibición.
- Se marcó correctamente cada placa con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Se saturó el papel de filtro con 5 ml de la dilución (concentraciones de As) a cada caja, evitando que se formen bolsas de aire. Siendo empleada el agua desionizada como control negativo y como medio de dilución.
- Con la ayuda de unas pinzas, se colocaron cuidadosamente 20 semillas de *Lactuca sativa* (previamente seleccionadas con un mismo tamaño), dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces y cuidando que no se dañen.

- Se taparon cada placa y se colocaron en bolsas plásticas negras para evitar la pérdida de humedad, cubriéndolas de la luz inmediatamente después de colocar las semillas.
- El bioensayo se realizó bajo condiciones de laboratorio donde se mantuvo incubada a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96 horas (4 días). Realizándose una prueba de toxicidad estática, haciéndose la lectura pasadas las 96 horas.
- Se realizaron seis repeticiones por cada dilución ensayada.
- Terminado el periodo de exposición, se realizó la observación general de los efectos fitotóxicos, a través de un estereoscopio.
- Se procedió a congelar las cajas de Petri correspondientes a los tratamientos y descongelarla a medida que se fueron midiendo.

3.2.7.1 Evaluación de fitotoxicidad

Terminado el periodo de exposición (96 horas), se realizó una observación detallada de las plántulas en cada placa de Petri, para evaluar el efecto en los puntos finales, de la germinación y del crecimiento en la elongación de la radícula e hipocótilo sobre el papel de filtro, con ayuda de un estereoscopio; observando cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas con tratamientos (concentraciones de As) y en los controles, como: ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes

poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidenció como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación se consideró además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocótilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

3.2.7.2 Puntos finales de evaluación de toxicidad

Como puntos finales se evaluó comparando el efecto generado en las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) expuestas al arseniato de sodio con respecto a la respuesta de las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) del control (blanco, compuesto por agua desionizada), sujetos a la mismas condiciones de ensayo (Castillo, 2004).

- **Efecto en la germinación:** se registró el número de semillas germinadas, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula; las semillas con una elongación menor a 2 mm se consideraron como semillas no germinadas.
- **Efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo:** utilizando un vernier se midió cuidadosamente la longitud de la radícula y del

hipocótilo de cada una de las plántulas, correspondientes a los controles y a cada concentración de tóxico. La medida de elongación de la radícula se consideró desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular; la medida de elongación del hipocótilo se consideró desde el nudo hasta la inserción de los cotiledones (ANEXO 6). Para facilitar la medición de la radícula e hipocótilo se procedió a congelar las cajas de Petri (de esta manera las plántulas adquieren una consistencia blanda) favoreciendo la medición.

Expresión de resultados

Se realizaron los siguientes cálculos:

- Porcentaje de inhibición en la germinación.
- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas de cada repetición.
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.
- Con los datos anteriores, se elaboraron las gráficas dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración.

3.2.8 Análisis estadístico

Para el análisis de las variables en estudio se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA), según los diferentes tratamientos se utilizaron la prueba de Dunnett que permitió realizar comparaciones pareadas entre las concentraciones utilizadas y el tratamiento control.

Para el cálculo de la concentración de inhibición (CE_{50-96}), se utilizó una función logarítmica, mediante el método estadístico de análisis de regresión por mínimos cuadrados ordinarios, que permitieron obtener los porcentajes de inhibición y la dosis a la cual corresponde la inhibición del 50 % del crecimiento del hipocótilo y radícula.

Para la elaboración de cuadros y figuras se utilizó el software SPSS 22,0.

IV. RESULTADOS

4.1 Bioensayo preliminar

Tabla 1.- Análisis de varianza para longitud de radícula de *Lactuca sativa* sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	FC	Pr > F
Concentraciones	5	25,68902778	5,13780556	31,96	<,0001
Error	12	1,92906667	0,16075556		
Total corregido	17	27,61809444			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 1, el análisis de varianza indica la existencia de diferencia estadística, altamente significativa entre las concentraciones ($P < 0,01$), lo cual indica que por lo menos alguna concentración muestra un efecto diferente en el crecimiento de la radícula, luego se procedió con la prueba de Dunnett que permitió comparaciones del control con cada una de las concentraciones.

Tabla 2.- Prueba de Dunnett para longitud de la radícula de *Lactuca sativa* sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.

Las comparaciones importantes del nivel 0,05 están indicadas por ***.				
Concentraciones Comparación	Diferencia entre medias	Simultáneo 95% Límites de confianza		
0,01 – 0	-0,1633	-1,1131	0,7864	N.S
0,1 – 0	-0,2700	-1,2198	0,6798	N.S
1 – 0	-0,9133	-1,8631	0,0364	N.S
10 – 0	-2,1300	-3,0798	-1,1802	***
100 - 0	-3,2667	-4,2164	-2,3169	***

*** Diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia

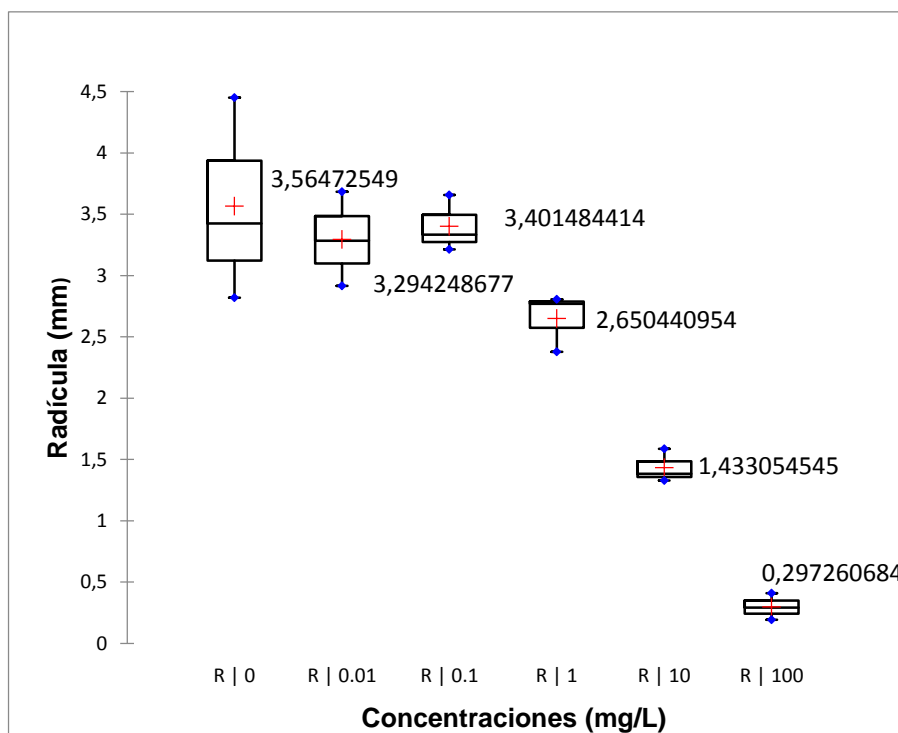


Figura 1.- Longitud de radícula (mm) de *Lactuca sativa* sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.

En la Tabla 2 y Figura 1 se muestran los resultados de la prueba de Dunnett, los resultados indican que no existe diferencia estadística entre el control y las concentraciones de 0,01 mg/L a 1 mg/L de arseniato de sodio ($P > 0,05$), mientras que para 10 y 100 mg/L sí se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0,05$). Estos resultados permiten concluir que las concentraciones de 0,01 mg/L a 1 mg/L de arseniato de sodio no produce efecto tóxico adverso observable, y que a partir de la concentración de 10 mg/L sí existe diferencia con el control, lo que indica que a partir de esta concentración ya se observa un efecto inhibitorio en la radícula.

Tabla 3.- Análisis de varianza para longitud del hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	FC	Pr > F
Concentración	5	7,73791111	1,54758222	8,40	0,0013
Error	12	2,21133333	0,18427778		
Total corregido	17	9,94924444			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3, el análisis de varianza indica la existencia de diferencia estadística, altamente significativa entre las concentraciones ($P < 0,01$), lo cual indica que por lo menos alguna concentración muestra un efecto diferente en el crecimiento del hipocótilo, luego se procedió con la prueba de Dunnett que permitió comparaciones del control con cada una de las concentraciones.

Tabla 4.- Prueba de Dunnett para longitud del hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.

Las comparaciones importantes del nivel 0,05 están indicadas por ***.				
Concentración Comparación	Diferencia entre medias	Simultáneo 95% Límites de confianza		
0,01 - 0	-0,6567	-1,6736	0,3602	N.S
0,1 - 0	-0,8033	-1,8202	0,2136	N.S
1 - 0	-0,9633	-1,9802	0,0536	N.S
10 - 0	-1,4000	-2,4169	-0,3831	***
100 - 0	-2,1233	-3,1402	-1,1064	***

*** Diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia

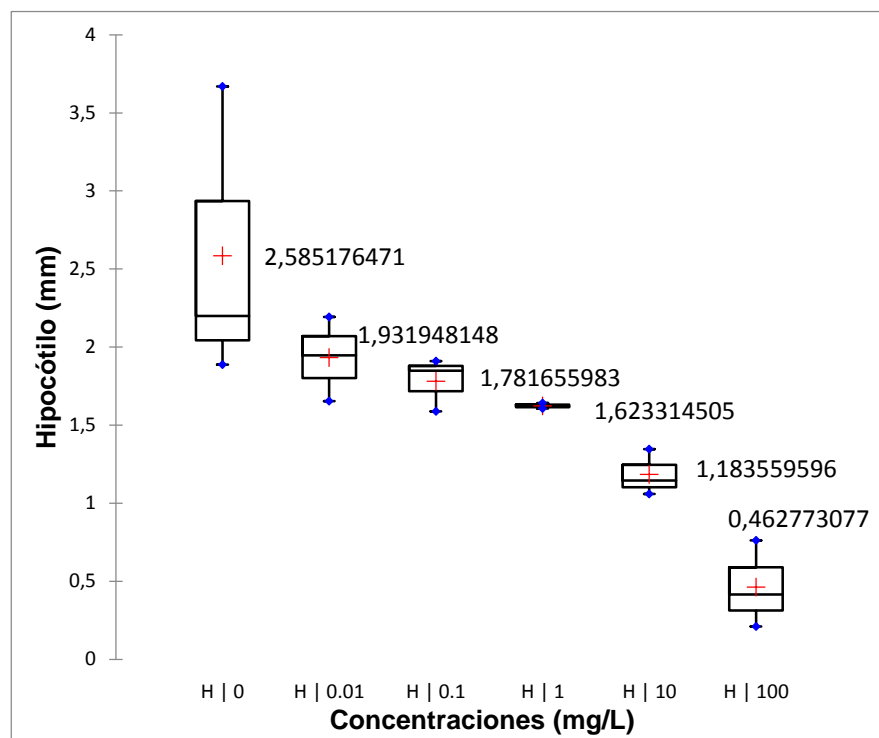


Figura 2.- Longitud del hipocótilo (mm) de *Lactuca sativa* sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.

En la Tabla 4 y Figura 2 se muestran los resultados de la prueba de Dunnett, los resultados indican que no existe diferencia estadística entre el control y la concentración de 0,01 mg/L a 1 mg/L de arseniato de sodio ($P > 0,05$), mientras que para 10 y 100 mg/L sí se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0,05$). Estos resultados permiten concluir que las concentraciones de 0,01 mg/L a 1 mg/L de arseniato de sodio no produce efecto tóxico adverso observable, y que a partir de la concentración de 10 mg/L sí existe diferencia con el control, lo que indica que a partir de esta concentración ya se observa un efecto inhibitorio en la radícula.

Tabla 5.- Resultados de inhibición (%) de *Lactuca sativa* sometida a cinco concentraciones de arseniato de sodio.

Concentración (mg/L)	Radícula	Hipocótilo	R%	H%
0	3,56	2,59	0	0
0,01	3,29	1,93	7,46	25,41
0,1	3,40	1,78	4,45	31,21
1	3,40	1,78	4,45	31,21
10	1,43	1,18	59,75	54,30
100	0,30	0,46	91,65	82,13

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 5, se presentan los porcentajes de inhibición de las concentraciones de arseniato de sodio que existen sobre la germinación, se observa que las dosis 0,01 ; 0,1 y 1,0 presentan similares porcentajes, por lo cual, se optó utilizar una de ellas, teniendo en cuenta los resultados de la tabla, se tomó la concentración 0,1 mg/L de As, debido a que el efecto adverso no observable estuvo hasta 0,1 mg/L, y de la cual se fijó las dosis restantes, siendo una de ellas menor a 10 mg/L, ya que se observa que esta produce un 59,75 % de inhibición en la radícula, existiendo un porcentaje apreciable con la próxima concentración, luego la dosis de 100 mg/L provoca un 91,65 % de inhibición, por lo que las dosis de concentraciones a usar son: **0 – 0,1 – 5 – 10 – 50 – 100 – 150 mg/L** de arseniato de sodio.

4.2 Bioensayo definitivo

4.2.1 Determinación de la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en la germinación de semillas de *Lactuca sativa*.

Tabla 6.- Resultados de germinación (%) de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Estadísticos	Concentraciones arseniato de sodio (mg/L)						
	0	0,1	5	10	50	100	150
N° de observaciones	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo (%)	85,00	80,00	55,00	50,00	30,00	20,00	0,00
Máximo (%)	95,00	90,00	60,00	55,00	60,00	55,00	30,00
Media (%)	90,83	86,67	58,33	53,33	51,67	30,83	14,50
Desviación típica (%)	3,76	4,08	2,58	2,58	12,11	13,20	11,98
Límite inferior (95%)	86,88	82,38	55,62	50,62	38,96	16,98	1,93
Límite superior (95%)	94,78	90,95	61,04	56,04	64,38	44,68	27,07

Fuente: Elaboración propia

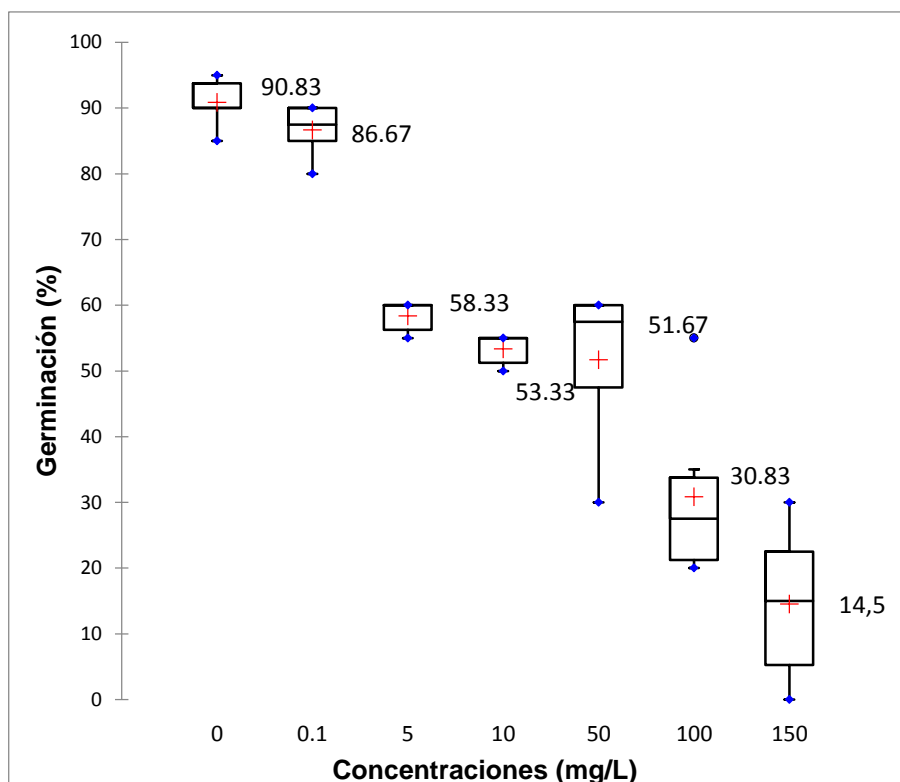


Figura 3.- Resultados de germinación (%) de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

En la Tabla 6 y Figura 3 se muestran los estadísticos descriptivos del porcentaje de germinación de semillas de lechuga, respecto a las 7 concentraciones de arseniato de sodio utilizadas, para el control se obtuvo $90,83 \pm 3,76$ %, mientras que para la concentración de 0,1 mg/L fue de $86,67 \pm 4,08$ %, para 5 mg/L se obtuvo $58,33 \pm 2,58$ % de germinación, para la concentración de 10 mg/L se tuvo $53,33 \pm 2,58$ %, para 50 mg/L la germinación fue $51,67 \pm 12,11$ %, para 100 mg/L se tiene $30,83 \pm 13,20$ % y para la concentración de 150 mg/L se obtuvo $14,50 \pm 11,98$ % de germinación.

Los valores mínimos de germinación se observaron en las concentraciones de 100 y 150 mg/L de arseniato de sodio con 20 y 0 % por efecto del contaminante sobre las semillas de lechuga, los valores máximos se observaron en el control con 95 % y la concentración de 0,1 mg/L con 90 % de germinación de semillas de lechuga.

El análisis comparativo se realizó mediante el análisis de varianza, para lo cual se realizó una transformación de datos a raíz cuadrada para lograr la homogeneidad de varianzas que requiere este método, los resultados se muestran a continuación.

Tabla 7.- Análisis de varianza para germinación de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Fuente	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	FC	Pr > F
Concentraciones	6	159,2175328	26,5362555	33,82	<.0001**
Error	35	27,4660138	0,7847433		
Total corregido	41	186,6835467			

** Diferencia altamente significativa

CV%=12,31

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 7, al realizar el análisis de varianza para el porcentaje de germinación, se encontró diferencia altamente significativa para las concentraciones utilizadas ($P < 0,01$), lo cual indica que por lo menos una concentración muestra efecto diferente al resto de concentraciones, para determinar la concentración con el efecto

adverso no observable, se procedió con la prueba de Dunnett que permitió comparaciones pareadas con el control.

Tabla 8.- Prueba de Dunnett para porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Concentraciones Comparación	Diferencia entre medias	Significancia
0,1 - 0	-0,2204	N.S
5 - 0	-1,8800	**
10 - 0	-2,2119	**
100 - 0	-2,3706	**
50 - 0	-4,0287	**
150 - 0	-6,0148	**

N.S: no significativo, ** Diferencia altamente significativa

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la prueba de Dunnett, los resultados indican que no existe diferencia estadística entre el control y la concentración de 0,1 mg/L de arseniato de sodio ($P > 0,05$), para el resto de combinaciones sí se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0,05$). Estos resultados permiten concluir que la concentración de 0,1 mg/L de arseniato de sodio no produce efecto toxico adverso observable en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga).

Para determinar la concentración inhibitoria media (CE_{50-96}) se realizó las conversiones respectivas del promedio de germinación del control con el resto de concentraciones, las mismas que se expresaron en porcentaje de inhibición de germinación.

Tabla 9.- Germinación promedio e inhibición de semillas de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Concentración (mg/L)	Germinación (%)	Inhibición (%)
0	90,83	0,00
0,1	86,67	4,58
5	58,33	35,78
10	53,33	41,29
50	51,67	43,11
100	30,83	66,06
150	14,5	84,04

Fuente: Elaboración propia

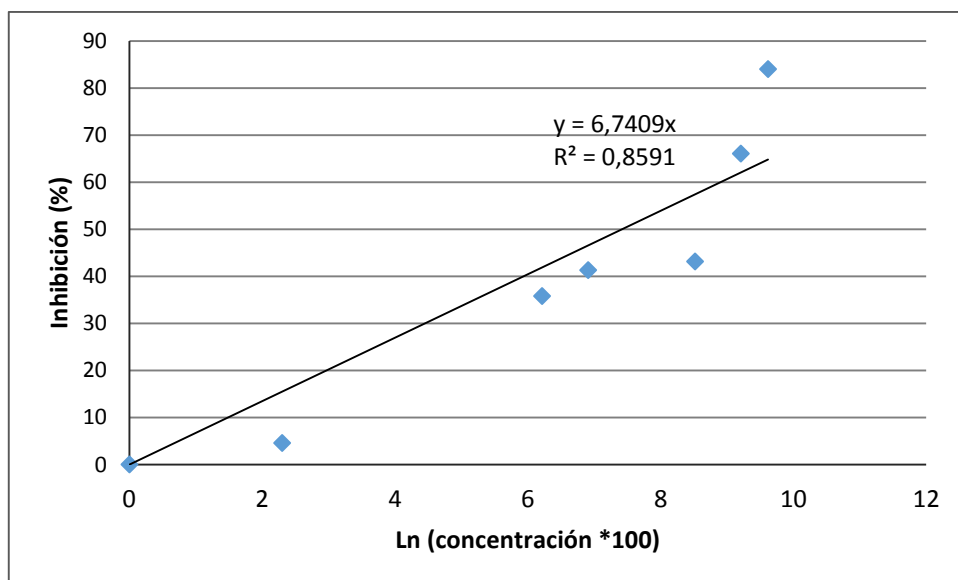


Figura 4.- Estimación de la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) de la germinación de semillas de *Lactuca sativa* sometida al arseniato de sodio.

En la Tabla 9 y Figura 4 se muestra los resultados de la estimación de la concentración media inhibitoria del arseniato de sodio sobre la germinación de semillas de lechuga, los valores se ajustaron a una ecuación semilogaritmica con un coeficiente de determinación de $R^2= 0,86$ que indica que la variación de las concentraciones utilizadas explican un 86 % de la respuesta que se observó en la germinación, por lo cual, esta ecuación se puede utilizar para estimar la CE₅₀₋₉₆.

La interpolación determinó que la concentración inhibitoria media (CE₅₀₋₉₆) del arseniato de sodio fue de 16,7 mg/L (ANEXO 15), con esta concentración se alcanza una inhibición de germinación del 50 % de las semillas de lechuga bajo las condiciones del estudio (laboratorio).

4.2.2 Determinación de la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en el crecimiento de la radícula en semillas de *Lactuca sativa*.

Tabla 10.- Resultados de longitud de radícula (mm) de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Estadísticos	Concentraciones arseniato de sodio (mg/L)						
	0	0,1	5	10	50	100	150
No. de observaciones	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	2,83	2,31	0,46	0,25	0,01	0,03	0,00
Máximo	3,70	3,41	1,03	0,88	0,21	0,60	0,03
Media	3,29	2,85	0,74	0,55	0,10	0,19	0,01
Desviación típica	0,35	0,53	0,24	0,25	0,08	0,20	0,02
Límite inferior (95%)	2,92	2,29	0,49	0,29	0,01	-0,02	-0,01
Límite superior (95%)	3,66	3,41	0,99	0,81	0,19	0,41	0,03

Fuente: Elaboración propia

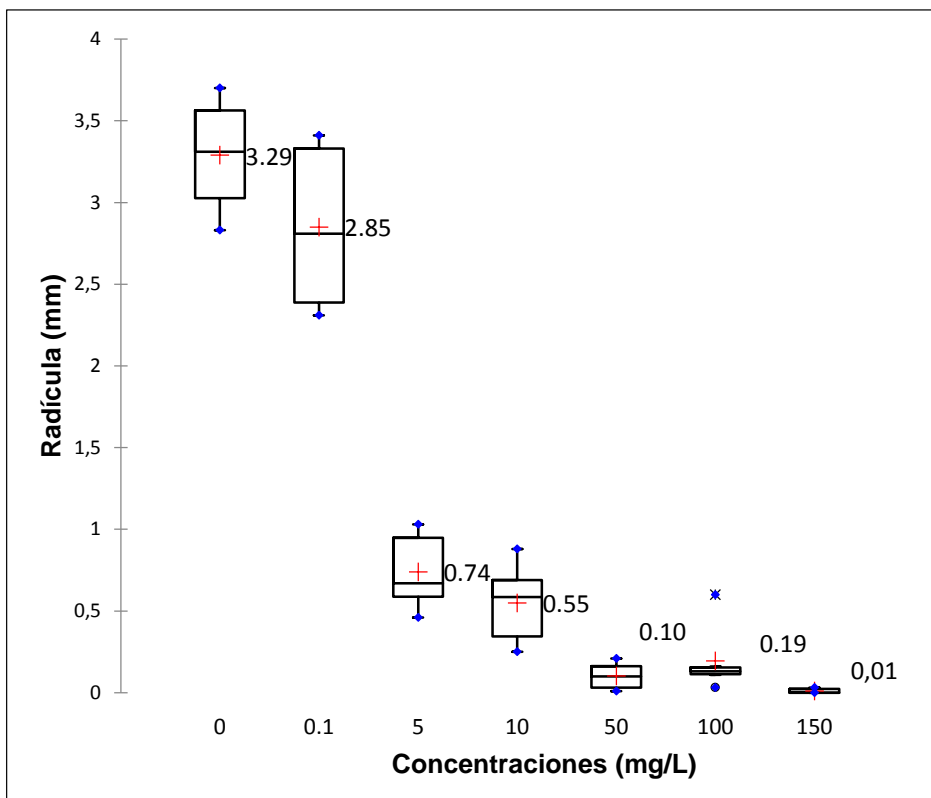


Figura 5.- Longitud de radícula (mm) de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

En la Tabla 10 y Figura 5 se muestra los estadísticos descriptivos de la longitud de radícula de semillas de lechuga expresada en mm, respecto a las 7 concentraciones de arseniato de sodio utilizadas, para el control se obtuvo $3,29 \pm 0,35$ mm, mientras que para la concentración de 0,1mg/L fue de $2,85 \pm 0,53$ mm, para 5 mg/L se obtuvo $0,74 \pm 0,24$ mm de longitud, para la concentración de 10 mg/L se tuvo $0,55 \pm 0,25$ mm, para 50 mg/L la longitud fue $0,10 \pm 0,08$ mm, para 100 mg/L se tiene $0,19 \pm 0,20$ mm y para la concentración de 150 mg/L se obtuvo $0,01 \pm 0,02$ mm de longitud de la radícula.

Los valores mínimos de longitud de radícula se observaron en las concentraciones de 100 y 150 mg/L de arseniato de sodio, con 0,03 y 0,00 mm de longitud, respectivamente por efecto del contaminante sobre las semillas de lechuga, los valores máximos se observaron en el control con 3,70 mm y la concentración de 0,1 mg/L con 3,41 mm de longitud de radícula.

El análisis comparativo se realizó mediante el análisis de varianza, para lo cual, se realizó una transformación logarítmica de datos para lograr la homogeneidad de varianzas que requiere este método, los resultados se muestran a continuación.

Tabla 11.- Análisis de varianza para longitud de radícula de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Fuente	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	FC	Pr > F
Concentraciones	6	1,57863053	0,26310509	155,36	<.0001**
Error	35	0,05927338	0,00169353		
Total corregido	41	1,63790391			

** Diferencia altamente significativa

CV%=2,30

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 11 el análisis de varianza para longitud de radícula, encontró diferencia altamente significativa para las concentraciones utilizadas ($P < 0,01$), lo cual indica que por lo menos una concentración muestra efecto diferente al resto de concentraciones,

para determinar la concentración con efecto adverso no observable, se procedió con la prueba de Dunnett que permitió comparaciones pareadas con el control.

Tabla 12.- Prueba de Dunnett para longitud de radícula de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Concentraciones Comparación	Diferencia entre medias	Significancia
0,1 - 0	-0,05572	N.S
5 - 0	-0,36764	**
10 - 0	-0,40143	**
100 - 0	-0,46734	**
50 - 0	-0,48464	**
150 - 0	-0,50266	**

N.S: no significativo, ** Diferencia altamente significativa

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la prueba de Dunnett, los resultados indican que no existe diferencia estadística entre el control y la concentración de 0,1 mg/L de arseniato de sodio ($P > 0,05$), para el resto de combinaciones sí se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0,05$). Estos resultados permiten concluir que la concentración de 0,1 mg/L de arseniato de sodio no produce efecto tóxico adverso observable, es decir, esta dosis es similar al control respecto al crecimiento de la radícula en semillas de lechuga.

Para determinar la concentración inhibitoria media (CE_{50-96}) se realizó las conversiones respectivas del promedio de longitud de la radícula del control con el resto de concentraciones, las mismas que se expresaron en porcentaje.

Tabla 13.- Crecimiento promedio e inhibición de crecimiento de radícula de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Concentración (mg/L)	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)
0	3,29	0,00
0,1	2,85	13,38
5	0,74	77,55
10	0,55	83,32
50	0,10	96,91
100	0,19	94,12
150	0,01	99,70

Fuente: Elaboración propia

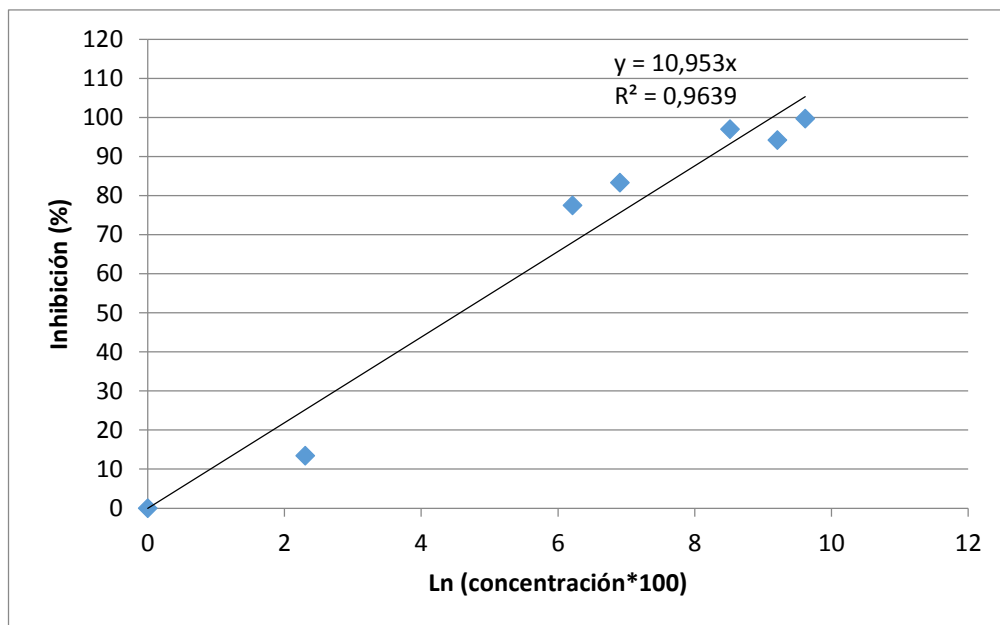


Figura 6.- Estimación de la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) del crecimiento de radícula de *Lactuca sativa* sometida al arseniato de sodio.

En la Tabla 13 y Figura 6 se muestra los resultados de la estimación de la concentración media inhibitoria del arseniato de sodio sobre la longitud de la radícula de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), los valores se ajustaron a una ecuación semilogaritmica con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,96$, que indica que la variación de las concentraciones utilizadas explican un 96 % de la respuesta que se observó en el crecimiento de la radícula, por lo cual, esta ecuación se puede utilizar para estimar la CE_{50-96} .

La interpolación determinó que la concentración inhibitoria media (CE₅₀₋₉₆) del arseniato de sodio fue de 0,96 mg/L (ANEXO 15), con esta concentración se alcanza una inhibición de crecimiento de 50 % de la longitud de la radícula de las semillas de lechuga bajo las condiciones del estudio (laboratorio).

4.2.3 Determinar la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en el crecimiento del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa*.

Tabla 14.- Resultados de longitud del hipocótilo (mm) de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Estadísticos	Concentraciones arseniato de sodio (mg/L)						
	0	0,1	5	10	50	100	150
No. de observaciones	6	6	6	6	6	6	6
Mínimo	1,80	1,21	0,54	0,61	0,32	0,25	0,00
Máximo	2,02	1,78	1,17	1,06	0,75	0,51	0,40
Media	1,88	1,47	0,95	0,90	0,62	0,40	0,27
Desviación típica	0,08	0,23	0,22	0,18	0,16	0,10	0,14
Límite inferior (95%)	1,80	1,23	0,72	0,71	0,45	0,29	0,12
Límite superior (95%)	1,97	1,71	1,18	1,08	0,78	0,50	0,42

Fuente: Elaboración propia

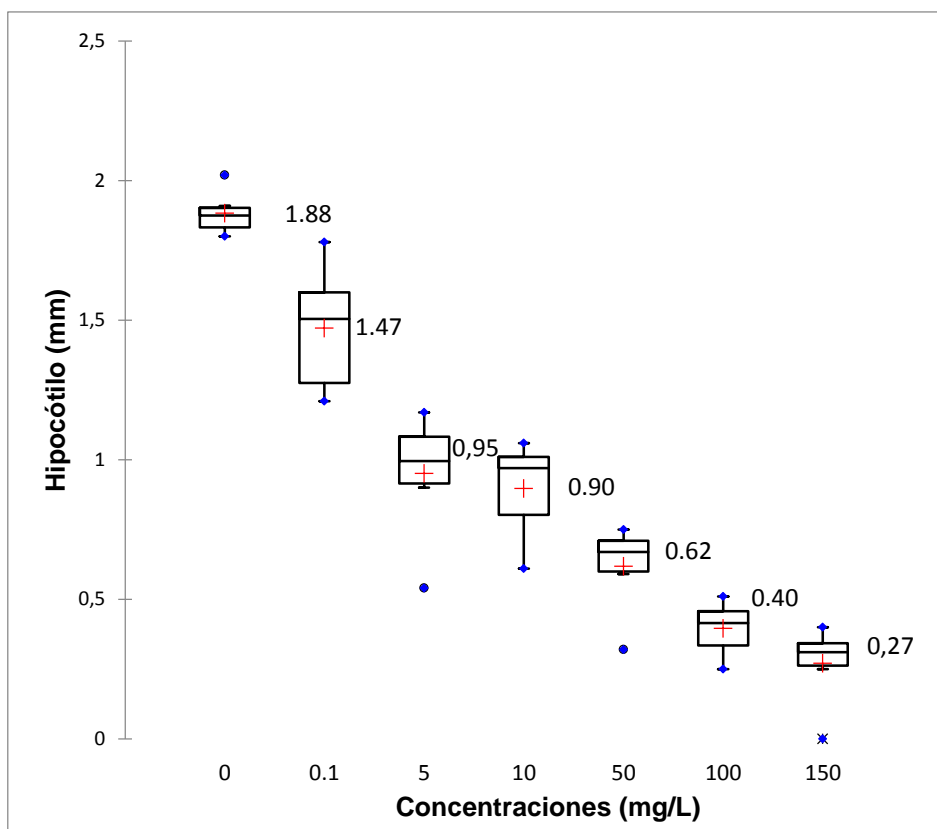


Figura 7.- Longitud del hipocótilo (mm) de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

En la Tabla 14 y Figura 7 se muestra los estadísticos descriptivos de la longitud del hipocótilo de semillas de lechuga expresada en mm, respecto a las 7 concentraciones de arseniato de sodio utilizadas, para el control se obtuvo $1,88 \pm 0,08$ mm, mientras que para la concentración de 0,1 mg/L fue de $1,47 \pm 0,23$ mm, para 5 mg/L se obtuvo $0,95 \pm 0,22$ mm de longitud, para la concentración de 10 mg/L se tuvo $0,90 \pm 0,18$ mm, para 50 mg/L la longitud fue $0,62 \pm 0,16$ mm, para 100 mg/L se tiene $0,40 \pm 0,10$ mm y para la concentración de 150 mg/L se obtuvo $0,27 \pm 0,14$ mm de longitud del hipocótilo.

Los valores mínimos de longitud del hipocótilo se observaron en las concentraciones de 100 y 150 mg/L de arseniato de sodio con 0,25 y 0,00 mm de longitud por efecto del contaminante sobre las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), los valores máximos se observaron en el control con 2,02 mm y la concentración de 0,1 mg/L con 1,78 mm de longitud del hipocótilo.

El análisis comparativo se realizó mediante el análisis de varianza, para lo cual, se realizó una transformación logarítmica de datos para lograr la homogeneidad de varianzas que requiere este método, los resultados se muestran a continuación.

Tabla 15.- Análisis de varianza para longitud del hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Fuente	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	FC	Pr > F
Concentraciones	6	0,33326054	0,05554342	69,23	<,0001**
Error	35	0,02808230	0,00080235		
Total corregido	41	0,36134283			

** Diferencia altamente significativa

CV%=1,60

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 15, el análisis de varianza para longitud del hipocótilo encontró diferencia altamente significativa para las concentraciones utilizadas ($P < 0,01$), lo cual indica que por lo menos una concentración muestra efecto diferente al resto de concentraciones,

para determinar la concentración con efecto adverso no observable, se procedió con la prueba de Dunnett que permitió comparaciones pareadas con el control.

Tabla 16.- Prueba de Dunnett para longitud del hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Concentraciones Comparación	Diferencia entre medias	Significancia
0,1 - 0	-0,06213	**
5 - 0	-0,14626	**
10 - 0	-0,15504	**
100 - 0	-0,20335	**
50 - 0	-0,24371	**
150 - 0	-0,26733	**

** Diferencia altamente significativa

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 16 se muestran los resultados de la prueba de Dunnett, los resultados indican que existe diferencia estadística significativa entre el control y el resto de concentraciones utilizadas ($P < 0,05$). Estos resultados permiten concluir que todas las concentraciones de arseniato de sodio producen efecto tóxico adverso observable, es decir aun la dosis de 0,1 mg/L produce una disminución del crecimiento del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* (lechuga).

Para determinar la concentración inhibitoria media (CE₅₀₋₉₆) se realizó las conversiones respectivas del promedio de longitud del hipocótilo del control con el resto de concentraciones, las mismas que se expresaron en porcentaje.

Tabla 17.- Longitud promedio e inhibición de crecimiento del hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Concentración (mg/L)	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)
0	1,88	0,00
0,1	1,47	21,86
5	0,95	49,56
10	0,90	52,39
50	0,62	67,17
100	0,40	79,03
150	0,27	85,66

Fuente: Elaboración propia

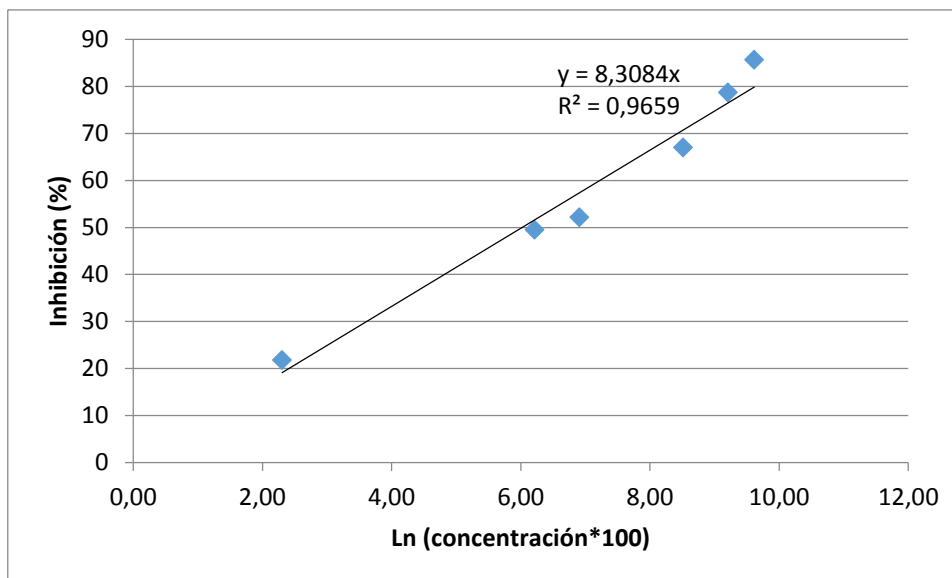


Figura 8.- Estimación de la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) del crecimiento del hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida al arseniato de sodio.

En la Tabla 17 y Figura 8 se muestra los resultados de la estimación de la concentración media inhibitoria del arseniato de sodio sobre la longitud del hipocótilo de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), los valores se ajustaron a una ecuación semilogaritmica con un coeficiente de determinación de $R^2= 0,97$, que indica que la variación de las concentraciones utilizadas explican un 97 % de la respuesta que se observó en el crecimiento del hipocótilo, por lo cual, esta ecuación se puede utilizar para estimar la CE_{50-96} .

La interpolación determinó que la concentración inhibitoria media (CE_{50-96}) del arseniato de sodio fue de 4,1 mg/L (ANEXO 15), con esta concentración se alcanza una inhibición de crecimiento de 50 % de la longitud del hipocótilo de las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) bajo las condiciones del estudio (laboratorio).

4.2.4 Efectos fitotóxicos del arseniato de sodio

Antes de retirar las plántulas de la placa de Petri se evaluó el efecto generado por los tratamientos del arseniato de sodio (concentraciones), respecto al control en *Lactuca sativa* (lechuga), terminando el periodo de exposición se observó:

4.2.4.1 Efecto en la Germinación

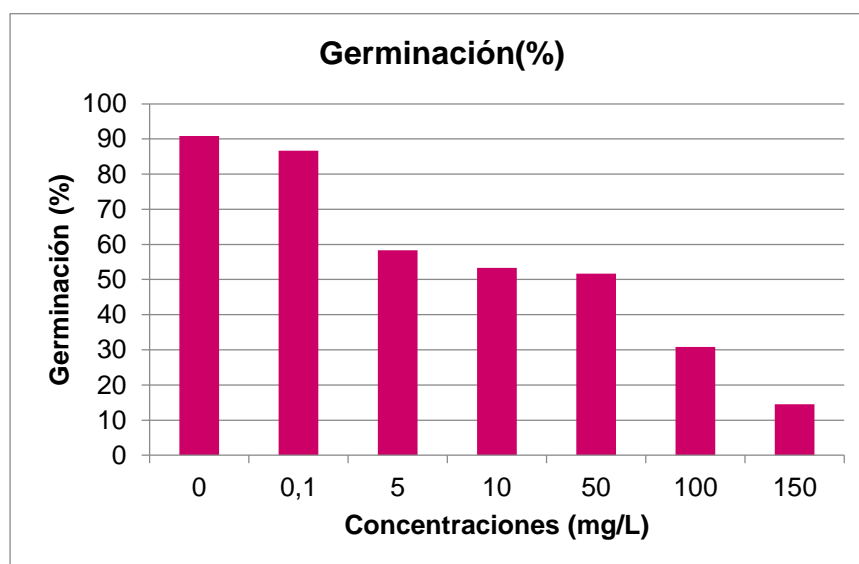


Gráfico 1.- Porcentaje de germinación promedio de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio, respecto al control.

Fuente: Tabla 9

En el Gráfico 1 se evidencia una relación inversamente proporcional entre el porcentaje de germinación y la concentración, es decir que a medida que aumenta la concentración de arsénico, el número de semillas germinadas

disminuye considerablemente. La gráfica nos muestra, que las semillas al contacto con una concentración de 0,1 mg/L existe una germinación del 86,67 % con una inhibición del 4,58 %; para 5 mg/L (58,33 %) hay una inhibición del 35,8 %; para 10 mg/L (53,33 %) hay una inhibición del 41,29 %; para 50 mg/L (51,67 %) hay una inhibición de 43,11 % e igualmente se observó una gran diferencia de germinación para 100 mg/L con el 30,83 % de semillas germinadas con una inhibición del 66,06 %, y para 150 mg/L se observó un 14,5 % de semillas germinadas y una inhibición del 84,04 %, siendo el porcentaje de germinación cada vez menor.

Dichos porcentajes difieren respecto al promedio de germinación del control con una germinación del 90,83 %. Así mismo, en las Imágenes del 1 al 7 del ANEXO 10, se observa la germinación de las semillas (*Lactuca sativa*) con las distintas concentraciones y el control respectivo. Notándose una disminución de germinación a mayores concentraciones respecto al control.

4.2.4.2 Fitotoxicidad en la radícula e hipocótilo

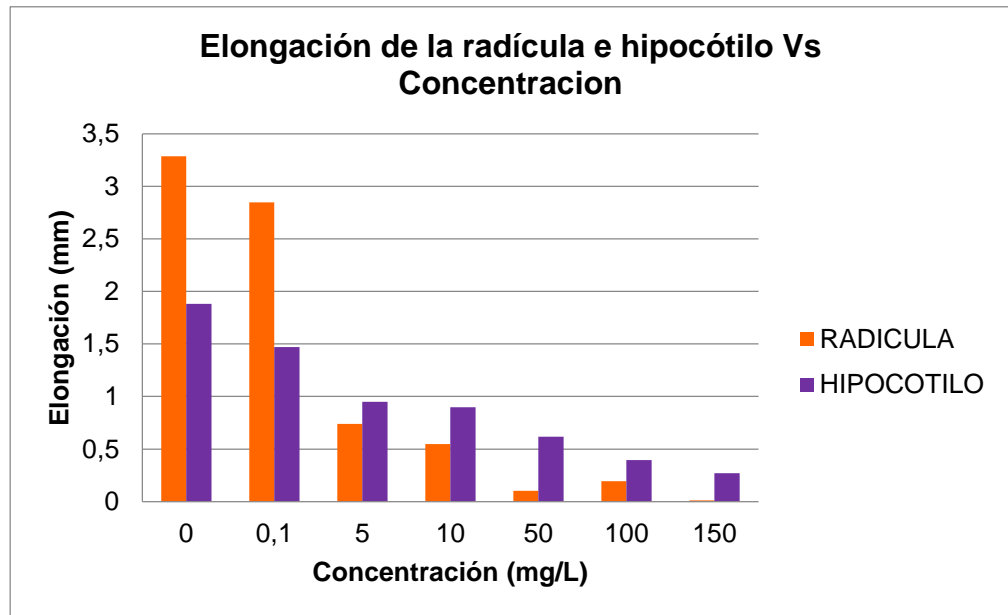


Gráfico 2.- Crecimiento promedio del crecimiento de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio.

Fuente: Tabla 13 y Tabla 17

En el Gráfico 2 se observa el promedio de la elongación de la radícula e hipocótilo frente a las diferentes concentraciones, teniendo en cuenta el crecimiento de elongación según la Tabla 13 y la Tabla 17, de radícula e hipocótilo respectivamente. Se identificó que en el control la elongación de la radícula es mayor que la elongación del hipocótilo, con un crecimiento de 3,29 mm y 1,88 mm, así mismo, se evidenció que en la concentración de 0,1 mg/L hubo un crecimiento de radícula (2,85 mm) y el hipocótilo (1,47 mm).

Sin embargo, a partir de la concentración de 5 mg/L se evidenció que a mayor concentración de arseniato hay mayor elongación del hipocótilo (0,95 mm) que la longitud de la radícula (0,74 mm), siendo así que para la concentración de 10 mg/L el crecimiento para radícula fue de 0,55 mm y del hipocótilo fue de 0,90 mm; para la concentración de 50 mg/L la radícula creció 0,10 mm y el hipocótilo creció 0,62 mm; para la concentración de 100 mg/L el crecimiento de la radícula fue de 0,19 mm y del hipocótilo fue de 0,40 mm; mientras que para la concentración de 150 mg/L en algunas de las semillas germinadas solo se evidenció un escaso crecimiento de hipocótilo (0,27 mm), concluyéndose que hay mayor afectación de la radícula en *Lactuca sativa* (lechuga).

Tabla 18.- Cuadro comparativo de los efectos fitotóxicos de la exposición del arseniato de sodio en *Lactuca sativa* (lechuga).

Observación	Control	0,1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
Pelos absorbentes	Abundante, en forma enmarañada, desde el nudo del hipocótilo a lo largo de la radícula (Imagen 9)	Presentes, por el nudo (Imagen 9.a)	Disminución de pelos absorbentes en el nudo de la radícula (Imagen 9.b)	Casi nula* (Imagen 9.c)
Punta de la radícula	Larga, ovalada con pelos absorbentes (Imagen 9)	Larga, ovalada, un pelos absorbentes	Larga, amarillenta, empezando a Necrosándose ** (Imagen 10)	Punta necrosada*** (Imagen 11.a)
Radícula	Delgada y muy larga (Imagen 8)	Algunas con mayor elongación que el control	Disminución de la elongación de la radícula* (más pequeña que el hipocótilo), tornándose amarillenta (Imagen 10)	Disminución de elongación ** (Imagen 11), Radícula tornándose amarillenta y necrosándose (Imagen 11.a - 11.b)
Hipocótilo	Grueso y larga (Imagen 8)	Grueso y largo	Más largo que la radícula* (Imagen 10)	Más largo que la radícula (Imagen 11)
Ensortijamiento	Radícula e hipocótilo	Ensortijado en ambos	Ensortijado mayor en hipocótilo (Imagen 10)	Levemente ensortijado en ambos. (Imagen 11.b)
Plántula	Germinada, verdes, abiertas	Algunas clorosis en las hojas	Algunas necrosis en las hojas (manchas) (Imagen 10)	Un poco amarillentas en zonas, con manchas necrosadas en ellas (Imagen 11.b)

Continúa...

Observación	Control	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L
Pelos absorbentes	Abundante, en forma enmarañada, desde el nudo del hipocótilo a lo largo de la radícula (Imagen 9)	Solo hay algunos por el nudo (Imagen 9.d)	Ausente (Imagen 9.e)	Ausente (Imagen 9.f)
Punta de la radícula	Larga, ovalada con pelos absorbentes (Imagen 9)	Punta necrosada*** (Imagen 12.b)	Punta necrosada y oscura *** (Imagen 13.a,13.e)	Punta necrosada**** (Imagen14.b), semillas no germinadas (Imagen 14.c,14.d)
Radícula	Delgada y muy larga (Imagen 8)	Radícula diminuta*** (Imagen 12.a), con color amarillenta, necrosándose (Imagen 12.b)	Radícula diminuta, necrosada*** (Imagen 13.a), débil, algunas muriéndose (Imagen13.d)	No hay radícula (Imagen 14.a, 14.b), en las que hubieron con menos de 0,1mm (Imagen 14.a)
Hipocótilo	Grueso y larga (Imagen 8)	Nudo entre hipocótilo y radícula necrosada, zonas necrosadas (Imagen 12.b)	Nudo necrosado (Imagen13.e), hipocótilo pequeño	Aún dentro de la cascarilla de la semilla, necrosada (Imagen 14.d), débil y muriéndose (Imagen 14.b)
Ensortijamiento	Radícula e hipocótilo	Un poco en hipocótilo, casi nada en la radícula (Imagen 12.b)	Se evidencia un poco en el hipocótilo, nada en la radícula (Imagen 13.d)	-
Plántula	Germinada, verdes, abiertas	Manchas necrosadas en general y bordes de las hojas (Imagen 12.b)	Manchas en los bordes y necrosadas (Imagen 13.a ; 13.c)	-

Fuente: Observaciones realizadas a plántulas de *Lactuca sativa* en laboratorio

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se buscó determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}) y efecto fitotóxico del arseniato de sodio en *Lactuca sativa* (lechuga) mediante bioensayos, por ser esta concentración una referencia del nivel de toxicidad del arsénico que puede llegar a causar efectos tóxicos al 50 % de la vegetación, regadas con fuentes hídricas, así mismo, se mostró los efectos fitotóxicos que el arsénico (en forma de arseniato de sodio) puede causar en la germinación y el crecimiento de la radícula e hipocótilo de las semillas de *Lactuca sativa*. Teniendo en cuenta que las fuentes hídricas de las cuencas de los ríos Uchusuma, Caplina, Sama y Locumba de la ciudad de Tacna presentan elevadas concentraciones de arsénico según los últimos monitoreos físico-químicos establecidos por la ANA (ANEXO 8), estos valores sobrepasan los límites permisibles establecidos por los ECA según el decreto supremo establecido por el MINAM (ANEXO 9).

Los resultados de la presente investigación fueron realizadas en base a los resultados de bioensayos preliminares, cuya herramientas, trabajos y metodología fueron tomados en base al protocolo de toxicidad descrito por (Castillo, 2004). Los bioensayos o ensayos de toxicidad preliminares se realizaron con semillas de *Lactuca sativa* var. *Great like*, para verificar si existe o no un efecto del arsénico en el desarrollo de *Lactuca sativa*, demostrándose en su análisis de varianza de la Tabla 1 y Tabla 3 para el crecimiento longitudinal de la radícula e hipocótilo respectivamente, que sí existen diferencias altamente significativas entre las concentraciones de los preensayos respecto al desarrollo de la planta del control, indicando que el arsénico produce efectos en el desarrollo de *Lactuca sativa*; se

demonstró comparando los tratamientos (concentraciones) con el control (testigo) por la prueba de Dunnett en la Tabla 2 y Tabla 4 para la radícula y el hipocótilo respectivamente, siendo para ambos casos que a partir del tratamiento de 10 mg/L de arsénico, en comparación al control, existe diferencia en el crecimiento de la radícula y el hipocótilo (se representa una diferencia significativa). Así mismo, en la Figura 1 y Figura 2, a través de su diagrama de caja (Box - Plot), usando el programa SPSS 22,0; se demostró que a pesar de existir algunos valores atípicos para el crecimiento de la radícula y el hipocótilo existe simetría en la distribución de los resultados (entre las cajas), indicando que sí existe efecto del arsénico en la germinación y crecimiento de *Lactuca sativa*, así como efectos fitotóxicos, y que los datos son factibles para determinar concentraciones para un bioensayo definitivo; y teniendo en cuenta la Tabla 05, se procedió a la realización del ensayo definitivo tomando concentraciones de: 0; 0,1 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L, 100 mg/L y 150 mg/L.

Los resultados representados por el diagrama de caja (Box - Plot) para los 3 casos: Porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* sometida a los tratamientos de As (Figura 3), crecimiento de la longitud de radícula (mm) de *Lactuca sativa* sometida a los tratamientos de As (Figura 05) y el crecimiento de longitud del hipocótilo (mm) de *Lactuca sativa* sometida a los tratamientos de As (Figura 7), se han encontrado algunas distribuciones sesgadas (asimétricas), siendo uno de ellos en la Figura 3 que a partir de 50 mg/L existe un elevado punto atípico (dato fuera del rango) dando una distribución asimétrica positiva así como en las concentraciones de 100 mg/L y 150 mg/L. Mientras que en la Figura 5 aunque la dispersión de los datos en concentraciones de 0,1 y 5 mg/L varían un poco se puede apreciar una mejor distribución de los datos simétricamente, en la concentración de

100 mg/L se observa un punto atípico (dato de fuera del rango) y se demuestra un claro efecto del arsénico en el desarrollo del crecimiento de la radícula. Así mismo, en la Figura 7 se observa un efecto del arsénico en el crecimiento del hipocótilo pese a encontrarse cierta asimetría y puntos atípicos (datos fuera del rango) en las concentraciones de 5 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L y 150 mg/L; en los 3 casos la dispersión de datos varían un poco, sin embargo, presentan datos normales. Para solucionar estos inconvenientes se realiza una transformación de datos a raíz cuadrada y poder lograr una mayor homogeneidad en los datos, aplicando una función que cambie sus valores, de modo que sigan más de cerca una distribución normal, aplicando el método descrito por Sir Ronald A. Fisher (1935), y así poder realizar el análisis comparativo mediante el análisis de varianza.

En la Tabla 7 del análisis de varianza, los porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* presentan una diferencia altamente significativa, lo que indica que para el intervalo de concentraciones ensayadas el arsénico genera una inhibición significativa en su germinación, con un coeficiente de varianza de 12,31 % indicando variabilidad en la germinación respecto a los tratamientos, puesto que algunos autores como Gómez y Gómez (1984) y Patel et al. (2001) señalan que los CV varían considerablemente de acuerdo al tipo de experimento, indicando que los rangos aceptables deben ser entre 6 a 8 % para evaluación de cultivares, 10 a 12 % para fertilización y 13 a 15 % para ensayos de evaluación de plaguicidas; por otro lado, Pimentel (1985) señaló que normalmente en los ensayos agrícolas de campo los CV se consideran bajos cuando son inferiores a 10 %; medios de 10 a 20 %, altos cuando van de 20 a 30 % y muy altos cuando son superiores a 30 %; así mismo, Ronald A. Fisher (1935), indicaron que en experimentaciones no controladas (condiciones de campo) el máximo

permitido de CV debe de ser 35 % y en condiciones controladas (laboratorio) no debe de superar el 10 %; varios investigadores (Gómez y Gómez, 1984; Martínez, 1988; Patel et al., 2001), indicaron que si el valor del CV supera el 30 %, los datos deben ser descartados por la baja precisión que tiene. En los resultados encontrados el coeficiente de variación fue del 12,31 % valor un poco elevado al de 10 % (para condiciones de laboratorio), dicho resultado han podido ser causa de diversos factores, como la dispersión de las semillas en la placa de Petri y una posible variación de la viabilidad de semillas, teniendo en cuenta que en el control de 20 semillas, llegaron a germinar entre 17, 18 y 19 semillas siendo quizás el porcentaje de germinación no la adecuada al 100 % de germinación, pero que sin embargo, los resultados obtenidos fueron aceptables para poder realizar la experimentación con bioensayos.

Mientras que el ANOVA de la Tabla 11 y Tabla 15 para el crecimiento longitudinal de la radícula e hipocótilo, respectivamente, presentan diferencias significativas para ambos casos, lo cual indica que por lo menos una concentración muestra efecto diferente al resto de concentraciones, el arsénico genera inhibición significativa en la elongación de la radícula y del hipocótilo, con un CV de 2,30 % para la radícula y un CV de 1,60 % para el hipocótilo, coeficientes de determinación aceptados por indicar mayor precisión en los resultados, demostrando que no existe mucha variabilidad en los datos respecto al crecimiento de la radícula y menor aun en crecimiento del hipocótilo, siendo los datos muy parecidos entre ellos y que son aceptados en condiciones de laboratorio, teniendo en cuenta lo descrito por Ronald Fisher (1935), pero que sin embargo, esta variación a pesar de ser poca se deben considerar los posibles errores al momento de la

medición, como diversos factores ya mencionados y el correcto uso del vernier.

En la Tabla 8, Tabla 12 y Tabla 16, la prueba de Dunnett permite comparar el efecto de los tratamientos (concentraciones) respecto del control (testigo) de la germinación, crecimiento radicular y crecimiento del hipocótilo respectivamente, para poder determinar la concentración con un efecto adverso no observable. Estos resultados indican que a la concentración de 0,1 mg/L de As no produce un efecto tóxico observable (significativo) en la germinación y el crecimiento radicular de *Lactuca sativa*, pero sí en el hipocótilo, es decir que a una dosis de 0,1 mg/L se produce una disminución en el crecimiento del hipocótilo de *Lactuca sativa*; mientras que para las otras concentraciones sí existen diferencias altamente significativas, es decir, existen efectos del arsénico en el desarrollo de la planta.

Para poder determinar la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) del arseniato de sodio en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* (Tabla 9), la determinación de la CE₅₀₋₉₆ del arseniato de sodio en el crecimiento de la radícula de *Lactuca sativa* (Tabla 13) y la determinación de la CE₅₀₋₉₆ de arseniato de sodio en del crecimiento del hipocótilo de *Lactuca sativa* (Tabla 17), se consideró los resultados representados en dichas tablas, tomando en cuenta el porcentaje de inhibición de la germinación y la longitud de inhibición del crecimiento de la radícula e hipocótilo, y el de los tratamientos (concentraciones); donde para poder encontrar el modelo, se aplicó una transformación de datos logarítmica a las tratamientos (concentraciones), pero antes teniendo en cuenta que algunos tratamientos se encuentran a 0 y 0,1 mg/L que al aplicar una transformación de datos logarítmica, darían resultados negativos, y teniendo en cuenta que para la

transformación logarítmica se realiza para números mayores a cero, se procedió a multiplicar cada concentración por 100 para obtener valores positivos y posteriormente realizar la transformación de datos logarítmica para distribuir los datos simétricamente, y poder tener una distribución normal de las variables, disminuyendo las diferencias de magnitud que pueden existir entre los datos de los tratamientos (concentraciones) y porcentaje de inhibición(%). Para así obtener el modelo lineal (ecuación) respectiva, para cada experimentación, representadas en las Figura 4, Figura 6 y Figura 8 y poder determinar la CE_{50-96} mediante la interpolación de los resultados (ANEXO 15).

Los coeficiente de determinación (R^2) para las tres pruebas demostraron ser confiables por tener un elevado porcentaje de confiabilidad, demostrando la calidad del modelo y describiendo en forma casi satisfactoria la relación que existe entre mis variables, los tratamientos (concentraciones) y el porcentaje de inhibición (respecto a la germinación, crecimiento de la radícula y crecimiento del hipocótilo), encontrándose un R^2 de 86 % para la germinación, un R^2 de 96 % para el crecimiento de la radícula y un R^2 de 96 % para el crecimiento del hipocótilo, valores elevados y confiables para las variables.

El uso de bioensayos empleando *Lactuca sativa* demostró ser un buen bioindicador de toxicidad y sensible, al igual que su uso en otros trabajos como: Sánchez y Sánchez (2009) quienes determinaron la concentración de inhibición media (CE_{50-120}) del bario, hierro y manganeso; Morales y Blanco (2011) determinaron la CI_{50-120} del molibdeno y el litio; Duarte (2011) estudió los efectos fitotóxicos que genera los vertimientos de una empresa galvánica, específicamente los vertimiento de cobre y de níquel; Pérez y

Baracaldo (2010) determinaron la CE_{50-120} producida por la plata (Ag^+) y los detergentes aniónicos (LAS); todos ellos mediante bioensayos de toxicidad usando semillas de *Lactuca sativa* en condiciones de laboratorio; demostraron que se puede obtener información útil usando bioensayos con *L. sativa* para determinar la toxicidad del arsénico, así como la CE_{50-96} y permitir establecer su efecto fitotóxico de la exposición del arsénico en vegetales.

Los resultados encontrados con exposición de arsénico a *Lactuca sativa*, la CE_{50-96} (Germinación), CE_{50-96} (Radícula) y CE_{50-96} (Hipocótilo), fueron de 16,72 mg/L, 0,96 mg/L y 4,1 mg/L respectivamente, indicando que es en la radícula donde se genera mayor toxicidad en la planta, teniendo en cuenta que la absorción del arsenito y del arseniato en la superficie radicular externa es bastante rápida e intensa, lo que explicaría la obtención de concentraciones muy altas de arsénico en las raíces de plantas (Wauchope, 1983, citado en Carbonell, Burló, y Mataix, 1995), afectando su fisiología, reduciendo su crecimiento y ausencia de pelos absorbentes, debido a que el arseniato es más rápidamente absorbido y translocado, en consecuencia hay una mayor toxicidad para las raíces; de tal forma, que si se trabaja con cantidades no letales de este último compuesto, se pueden observar concentraciones similares tanto en hojas como en raíces.

Al comparar el efecto fitotóxico del arsénico en la elongación de la radícula respecto a la del hipocótilo, se observa que los efectos fueron mayores en la radícula, (Gráfico 1) e (Imágenes del 1 al 7), siendo el arsénico más tóxico en la radícula que el hipocótilo, inhibiendo en menor medida la elongación y división celular del hipocótilo, esto podría deberse a la dificultad de translocación de este metal, de la radícula a los órganos

aéreos de la plántula (Kabata, Pendias, y Pendias, 1985; Barceló y Poschenrieder, 1997; Sanitá di Toppi y Gabbrielli, 1999). Puesto que el arsénico es un metal no esencial cuyo crecimiento en plantas varía ampliamente con las concentraciones de As.

Esta experimentación demuestra que aun en concentraciones muy elevadas de As, *Lactuca sativa*, llega a tolerar dichas concentraciones, pudiendo llegar a germinar el 50 % a una concentración de 16,72 mg/L y desarrollarse, comparando lo dicho por Woolson, 1973, citado en Carbonell, Burló, y Mataix (1995), quienes describieron que es raro que la acumulación de arsénico en las plantas alcance niveles perjudiciales para los seres vivos, porque invariablemente el crecimiento es reducido antes de que el contenido alcance niveles tóxicos. Sin embargo, al no producir un efecto visible, la acumulación de arsénico en vegetales a través del riego, a concentraciones muy elevadas y que superan los límites permisibles, es un hecho que sí existe, demostrado en diversos trabajos como Prieto y cols. (2005), quienes realizaron un estudio del nivel de acumulación de arsénico en tejidos vegetales en la región de Zimapán - México, con pozos que exceden concentraciones de 0,25 mg/L a 1,5 mg/L de As, mostró mayor capacidad de acumulación de As en la hojas, caso del perejil con 10,73 mg/kg de As en sus hojas, el epazote con 12,39 mg/kg de As en sus hojas y 10,16 mg/kg en la raíz, así mismo, encontró valores promedios de la concentración de As en hortalizas cultivadas como: *Lactuca sativa* (lechuga) hoja < 0,018 mg/kg de As, *Brassica oleraceae* (col) hoja < 0,018 mg/kg de As, *Beta vulgaris* (acelga) hoja < 0,018 mg/kg de As, entre otras.

Carrión (2009), en su análisis de arsénico en tres alimentos, producidas en las zonas afectadas por el volcán Tugurahua (Guano - Penipe) en Riobamba - Ecuador, determinó concentraciones de As en 2 sectores: encontrando en la papa 0,03915 mg/kg y 0,03511 mg/kg de As, respectivamente; en el maíz encontró 0,03080 mg/kg y 0,02713 mg/kg de As y en la leche se encontró 0,03575 mg/L y 0,04467 mg/L de As, respectivamente.

Prieto y cols., (2010), determinaron los niveles de bioacumulación de arsénico en órganos y tejidos de cebada maltera (*Hordeum distichon L.*) bajo condiciones controladas, encontrando una elevada acumulación de arsénico en sus diferentes etapas de desarrollo, donde la raíz presentó la más alta concentración de arsénico acumulada (100 y 300 mg/kg), seguida por las hojas (80 a 180 mg/kg) y el tallo (70 a 110 mg/kg); mientras que la acumulación de arsénico observado en granos (órgano comestible) resultó ser relativamente alto (40 - 90 mg/kg) de arsénico.

Ruiz y Armienta (2012) evaluaron la acumulación del arsénico y efectos en el desarrollo de plantas de maíz (*Zea mays L.*) crecidas en invernadero bajo condiciones controladas (temperatura, humedad relativa y radiación solar) por 70 días, encontrándose intervalos entre 0,1 a 0,8 mg/kg de As en la raíz y parte aérea (tallo y hojas), pero que aún en concentraciones bajas se ha observado que el As puede reducir el rendimiento de los cultivos. El As presentó concentraciones en la parte aérea del maíz de 0,2 mg/kg y 0,8 mg/kg. Mientras que Kabata y Pendias (2001), reportaron para granos de maíz dulce en el intervalo de 0,03 a 0,4 mg/kg As.

Caballero, Carrillo, Gómez, y Jerez (2010), en Oaxaca, México, determinaron presencia arsénico en cultivos de tomate, difieren de otros trabajos pues cultivos regados con pozos contaminados de 0,025 mg/L de arsénico, no se detectó ningún valor, quienes descartaron la presencia As en niveles que pudieran ser dañinos los frutos de jitomate, hojas de lechuga, raíces de zanahoria, granos de frijol y maíz, lo que sugiere que no existe exposición crónica. Lo que indica que a mayor concentración de arsénico mayor será la acumulación de éste en los vegetales y mayor será el riesgo de consumo en elevadas concentraciones de As en vegetales y alimentos expuestos.

Teniendo en cuenta los reportes fisicoquímicos reportados por el ANA en los últimos años (ANEXO 8) las concentraciones de arsénico en las fuentes superficiales de las cuencas de Tacna, superan en gran medida los límites establecidos por los ECA para la categoría 3 (ANEXO 9). Siendo motivo de estudio e indicios de una posible acumulación de As en vegetales regadas por dichas aguas, en base a las otras investigaciones, mencionadas.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la CE_{50-96} del arsénico en la radícula es de 0,96 mg/L, dicha concentración no se encuentra alejado de los últimos reportes dados por el ANA (ANEXO 8) dado que se han encontrado en la cuencas Locumba y Sama hasta concentraciones de 0,7878 mg/L de As, lo que determina que se está produciendo un efecto tóxico y posible acumulación del arsénico en los vegetales.

La Comisión Mixta FAO/WHO del Codex alimentarius ha fijado la máxima ingesta tolerable de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal y según la OMS el consumo

humano diario no debe exceder los 0,025 - 0,040 mg/kg, pues una ingestión mayor llevaría a la acumulación de estos metales en órganos como el hígado y riñones, que pueden afectar su funcionamiento (Barragán, 2008). Mientras que para Díaz (1999), la dosis de arsénico que un ser humano puede ingerir sin presentar un riesgo de cáncer es 0,0105 mg/L por día para una persona de 70 kg (Prieto y cols., 2005).

Así mismo, se demostró que la fitotoxicidad ocasionada por arsénico en la germinación, y el crecimiento de la radícula y el hipocótilo están relacionadas con la concentración de arsénico administrada, evidenciándose la reducción del crecimiento (Gráfico 2), como uno de los síntomas visuales que se atribuye al arsénico, descrito por Moreno (2010), así como Gonzales (1994) quienes al buscar establecer niveles de As estos podrían ser absorbidos y acumulados con concentraciones gradualmente crecientes (0,1 ; 1,0 ; 10 mg/L) encontró que el rendimiento de hortalizas (lechuga, pepino y zanahoria) disminuye con el aumento de la concentración de As, representando un impacto en los cultivos.

En el presente trabajo se ha establecido y observado síntomas de fitotoxicidad, como reducción de la elongación radicular o del hipocótilo, falta de pelos absorbentes, reducción de ensortijamiento, clorosis en hojas y necrosis en distintas áreas de la plántula, encontrándose en los tratamientos (concentraciones de As). Así en la Tabla 18 se describen estos efectos fitotóxicos encontrados en las concentraciones respecto al control, así como los síntomas visibles en su desarrollo (ANEXO 10), síntomas que concuerdan con los estudios realizados por (Ruiz y Armienta, 2012), quienes al exponer As en el desarrollo de plantas de maíz (*Zea mays* L.) mostraron síntomas visibles de afectación: necrosis, clorosis,

adelgazamiento de las hojas e inhibición del crecimiento, así mismo: (Franco, Castillo, González, y Santillán, 2012) al evaluar el efecto del riego con aguas de diferentes concentraciones de As en cultivos de *Eura sativa* apreció un crecimiento reducido en relación a nivel de arsénico. Mientras que (Prieto y cols., 2006) al evaluar el efecto genotóxico del arsénico en raíces de *Vicia faba* regadas con muestras de agua contaminadas, demostraron que las altas concentraciones de arsénico puede provocar efectos genotóxicos que se manifiestan por la inducción de micronúcleos en las células meristemáticas de raíces de tejidos vegetales sensible, pudiéndose apreciar el rompimiento de un cromosoma anafásico y la aparición de micronúcleos en las células meristemáticas, encontrándose una reducción de 9,6 veces la división celular de las muestras de agua con elevadas concentraciones de As respecto a las del control. A través de los resultados obtenidos demostraron la toxicidad y efectos fitotóxicos que arsénico genera en plantas.

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó la concentración de inhibición media del arsénico que causa un efecto tóxico al 50 % de la germinación y crecimiento de *Lactuca sativa*, mediante bioensayos en condiciones de laboratorio, así como los efectos fitotóxicos generados a elevadas concentraciones de As en el desarrollo de *Lactuca sativa*.
- Se determinó que la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) del arseniato de sodio en la germinación de semillas de *Lactuca sativa*, es de 16,72 mg/L, produciendo una inhibición en un 50 % de su germinación.
- Se determinó que la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) del arseniato de sodio en el crecimiento de la radícula de *Lactuca sativa* fue de 0,96 mg/L, afectando el 50 % del crecimiento radicular.
- Se determinó que la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₉₆) del arseniato de sodio en el crecimiento del hipocótilo de *Lactuca sativa*, es de 4,1 mg/L, afectando el 50 % del crecimiento del hipocótilo.

- El arseniato de sodio afectó la germinación y crecimiento de la radícula e hipocótilo, afectando el desarrollo de la plántula, produciendo síntomas de fitotoxicidad como la ausencia de pelos absorbentes, reducción de ensortijamiento, clorosis en hojas y necrosis en distintas áreas de la plántula, siendo que a mayor concentración mayor será el efecto tóxico del arsénico en la planta (Tabla 18).

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar otros bioensayos de toxicidad con el arsénico. Así mismo, el estudio de diversos afluentes, aguas residuales, aguas contaminadas u otros compuestos que generan toxicidad en los organismos, para evaluar la importancia de su efecto tóxico y el impacto que este puede generar al medio ambiente.
- Se recomienda la realización de estudios y trabajos que demuestren la acumulación de arsénico en diversos cultivos de la región de Tacna, regadas con elevadas concentraciones de As, por ser la vegetación un medio de ingesta directa en el hombre.
- Se recomienda dar a conocer a las autoridades, que las concentraciones que sobrepasan los límites permisibles para la categoría 3 en Tacna, también son de importancia por ser aguas sin tratar y de las que se riegan a diversos cultivos, llegando a producir efectos fitotóxicos aun sin ser visualizados, así como una posible acumulación del As a cultivos.
- Se recomienda la elaboración de tratamientos y biorremediación para la reducción del arsénico en el agua, verificando su efecto con nuevos bioensayos, estableciendo en qué medida reduce el efecto fitotóxico en plantas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Atencio Mamani, W. R. (2013).** Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆) y efecto histopatológico del sulfato de cobre mediante bioensayos con alvinos del carachi amarillo (*Orestias leteus*). Universidad Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
2. **Barragán Moreno, O. L. (2008).** Estudio de diferentes metodologías para determinar la biodisponibilidad de cadmio y arsénico en suelos y su relacion con la concentración en plantas. NOVA, 6, 35/39.
3. **Barrios Arrega, N. E. (2004).** Evaluación del cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa*) bajo condiciones hidropónicas en Pachalí, San Juan Sacatepéquez, Guatemala.
4. **Caballerro Gutierrez, P. U., Carrillo Rodriguez, J., Gomez Ugalde, R. M., y Jerez Salas, M. P. (2010).** Presencia de Arsénico en pozos y en cultivos, en Oaxaca, México. Agronomía Mesoamericana, 177-184.
5. **Cáceda Quiroz, C. J. (2006).** Aplicación de bioensayos en la medición de toxicidad por metales pesados en fuentes superficiales de agua para consumo humano. Ciencia y Desarrollo, 35-38.
6. **Carbonell Barrachina, A. A., Burló Carbonell, F. M., y Mataix Beneyto, J. J. (1995).** Arsénico en el sistema Suelo-Planta. España: Espagrafic.

7. **Carrión Samaniego, X. M. (2009).** Análisis de la concentración de Arsénico en tres alimentos producidas en las zonas afectadas por el volcán Tungurahua (Guano-Penipe). Riobamba, Ecuador.
8. **Carro Perez, M., Francisca, F., y Cebollada Verdaguer, M. P. (2007).** Discusión de los límites de concentraciones de arsénico en aguas subterráneas para la provincia de Córdoba. Taller de Arsénico en Agua, 1-8.
9. **Castillo, G. (2004).** Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
10. **Castro de Esparza, M. L. (24 de Junio de 2006).** Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. 1-14. México, Lima, Perú: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS-SB/SDE/OPS).
11. **Duarte Castro, D. E. (2011).** Determinación de la concentración de inhibición media (CE₅₀) de cobre y níquel para la semilla *Lactuca sativa* mediante ensayos de toxicidad. Bogotá.
12. **Elika. (29 de Noviembre de 2013).** Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria.
13. **Franco, A., Ponce, S., y Rodríguez, J. (2012).** Actividad hidrogeológica del sur del Perú, una evaluación situacional de las cuencas de Sama y Locumba. Lima: Tecnia.

14. **Franco, L., Catillo, N., González, M., y Santillan, J. (2012).** Arsénico y medio ambiente: Efecto del riego con aguas conteniendo As sobre cultivos Hortícolas. 7mo congreso de Medio Ambiente.
15. **Gaete, H., y Chavéz, C. (2008).** Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1974) (Cladocera, crustacea). *Limnetica*, 1-10.
16. **Galetovic, A., y De Fernicola, N. (2003).** Arsénico en el agua de bebida: Un problema de salud pública. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 365-372.
17. **Gonzales Galeano, S. (1994).** Contaminación por Cadmio y Arsénico en suelos y hortalizas en un sector de la cuenca del río Bogotá. Bogotá, Colombia.
18. **INRENA-DGAS. (2002).** Evaluación y Ordenamiento de los Recursos Hídricos en las cuencas de los ríos Caplina y Uchusuma. Tacna.
19. **Lannacone, J., Alvariño, L., y Paredes, C. (Setiembre de 2009).** Evaluación del Riesgo Ambiental del Arseniato de Plomo en Bioensayos con Ocho Organismos no destinatarios. Lima, Perú.
20. **Manzano Gutierrez, R. (2013).** Selección de plantas y enmiendas para la recuperación de suelos de minas contaminados con arsénico y metales pesados. Madrid, España.

21. **Mayorga, P. (2011).** Arsénico en aguas subterráneas su transferencia al suelo y a la planta. Tesis para optar al grado de doctora , Universidad de Valladolid.
22. **Morales Riveros, L. B., y Blanco Rey, I. E. (2011).** Determinación de la concentración de inhibición media (CL₅₀₋₁₂₀) del molibdeno y el litio en semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*), mediante ensayos de toxicidad. Trabajo de grado para optar al Título de Ingeniera Ambiental y Sanitaria, Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
23. **Moreno Jiménez, E. (2010).** Recuperación de suelos mineros contaminados con Arsénico mediante fitotecnologías. Madrid, España.
24. **OMS, (24 de Mayo de 2006).** Mitigación de los efectos del arsénico presente. Informe de Secretaria.
25. **Perez Oyola, F. E., y Baracaldo Cubides, C. A. (2010).** Determinación de la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₁₂₀) producida por la plata (Ag⁺) y los detergentes aniónicos (LAS) mediante bioensayos de toxicidad sobre semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*). Bogotá.
26. **Pérez Vásquez, P. A. (2013).** Evaluación de Arsénico en orina de pobladores adultos del distrito de Ite Tacna 2012. Tacna, Perú.

27. **Ponce, R., Cabana, M., Vaira, M., y A Giunta, S. (2007).** Bioensayo para determinar la toxicidad y la bioactividad de alcaloides de *Coronopus dydimus*. Boletín Latinoamericano del Caribe de plantas medicinales y Aromáticas, 267-269.
28. **Ponce, R., Farías, S., Vélez, D., y Montoro, R. (2006).** Determinación de Arsénico total e inorgánico en carne y vísceras de camelidos (*Lama glama*) autóctonos de la Provincia de Jujú, Argentina. 105-109. Buenos Aires, Argentina.
29. **Prieto Garcia, F., Callejas H, J., Lechuga, M. d., Gaytán, J., y Barrado, E. (2005).** Acumulación en tejidos vegetales de Arsénico proveniente de aguas y suelos de Zimapán, estado de Hidalgo, México. México: Bioagro.
30. **Prieto Garcia, F., Prieto Méndez, J., Callejas Hernández, J., Román Gutierrez, A. D., y Méndez Marzo, M. A. (2010).** Bioacumulación de Arsénico en las etapas de desarrollo de la Cebada Maltera (*Hordeum distichon L*). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 33-44.
31. **Prieto Méndez, J., González Ramírez, C., Román Gutiérrez, A., y Prieto Garcia, F. (2009).** Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. 29-44. México.

- 32. Prieto, F., Vargas, M. D., Méndez, M., Barrado, E., y Gaytán, J. C. (2006).** Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. *Ciênc. Technol. Aliment.*, Campinas, 94-97.
- 33. Prieto, J., González, C., Román, A., y Prieto, F. (2009).** Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 29-44.
- 34. Republica. (14 de Octubre de 2013).** Inician estudio sobre efectos de tomar agua con arsénico.
- 35. Rivas, J., Aguirre, M., y Salas, W. (2002).** Evaluación y Ordenamiento de los Recursos Hídricos en las Cuencas de los ríos Caplina y Uchusuma. Estudio Hidrológico, Instituto Nacional de Recursos Naturales, Tacna.
- 36. Rodríguez, R., y Echevarría, M. (2008).** Reducción de Arsénico en agua. Argentina: Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional - U.T.N.
- 37. Ruiz Huerta, E. A., y Armienta Hernández, M. A. (2012).** Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Int. Contam. Ambie*, 103-107.

38. **Sánchez Ortiz, K. A., y Sánchez Melo, L. M. (2009).** Determinación de la concentración de inhibición media (CE₅₀₋₁₂₀) del bario, hierro y manganeso mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*). Bogotá.
39. **Sobrero, M. (2010).** Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas. Tesis presentada para optar por el título de Doctor, Universidad de la Plata, Argentina.
40. **Torres Escribano, S. (2011).** Biodisponibilidad de Arsénico y Mercurio en alimentos con potencial riesgo toxicológico. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, Valencia.
41. **Valencia Herrera, J. (2009).** Aplicación de isotopos ambientales para la mitigación de la contaminación de Arsénico en la cuenca del río Maure. Lima, Perú.
42. **Vargas Palominos, L., Martinez Trujillo, M., Ortiz castro, R., y López Bucio, J. (Diciembre de 2007).** Efecto de metales pesados sobre crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana L.* Ciencia Nicolaita, 101-111.
43. **Vazquez, H., Ortolani, V., Rizzo, G., Bachur, J., y Pidustwa, V. (2000).** Arsénico en aguas subterráneas criterios para la adopción de límites tolerables. Santa Fe, Argentina.

IX. ANEXOS

ANEXO 1.- Glosario

1. **AGUA DESIONIZADA:** Es aquella a la cual se le han quitado los cationes, como los de sodio, calcio, hierro, cobre y otros, y aniones como el carbonato, fluoruro, cloruro, etc., mediante un proceso de intercambio catiónico; esto significa que el agua se le han quitado todos los iones excepto H^+ , o más rigurosamente H_3O^+ y el OH^- , pero puede contener pequeñas cantidades de impurezas no iónicas como compuestos orgánicos.
2. **ANOVA:** El análisis de varianza (ANOVA) sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos, el procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observa en los grupos de datos numéricos a comparar.
3. **BIOENSAYO:** Llamado también ensayo de toxicidad, se emplean como herramientas para generar diagnósticos sobre los efectos que puede generar un agente tóxico sobre un organismo definido, bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Esta relación se puede determinar por muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos.

4. **BIOENSAYO DEFINITIVO:** Es una prueba diseñada para establecer la concentración a la cual se presenta el efecto final establecido, donde los periodos de exposición son mayores que las pruebas preliminares y las de intervalo, se utilizan múltiples concentraciones a estrechos intervalos y múltiples replicas.
5. **BIOENSAYO PRELIMINAR (Screening):** Prueba para determinar si se produce un impacto, estas pruebas se diseñan utilizando una concentración, múltiples replicas y una exposición de 24 a 96 horas.
6. **CONCENTRACIÓN DE INHIBICIÓN MEDIA (CE₅₀):** Concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50 % de los organismos de ensayo (por ejemplo inmovilidad) al 50 %. La CE₅₀ y sus límites de confianza (95 %) son usualmente derivados de análisis estadístico. En un determinado periodo de exposición.
7. **CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀):** Concentración calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, capaz de generar un efecto mortal, al 50 % de los organismos, de una población, utilizados en pruebas de laboratorio, bajo condiciones determinadas, donde la CL₅₀ y sus límites de confianza (95 %) son usualmente derivados de análisis estadístico.
8. **CONTAMINANTE:** Se determina como una sustancia extraña, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta. También se le define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, en lugares, formas, concentraciones y con una duración que

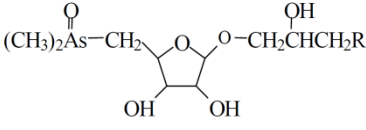
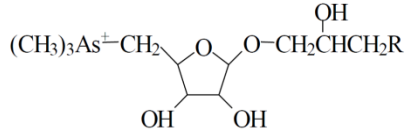
sean nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal.

9. **CONTROL:** Es un tratamiento en una investigación que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada (sinónimo de control negativo).
10. **COMPUESTO TÓXICO:** Es aquel capaz de dañar un sistema biológico, interfiriendo su funcionamiento normal o provocando su muerte.
11. **EFFECTO AGUDO:** Efecto deletéreo causado por agentes químicos a organismos vivos, que se manifiesta rápida y severamente; generalmente, este efecto ocurre después de un corto período de exposición (0 a 90 horas).
12. **EFFECTO LETAL:** Respuesta a un estímulo, en concentraciones de un agente tóxico, que causa la muerte por acción directa.
13. **ENSAYO DE TOXICIDAD:** Determinación del efecto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas; mide las proporciones de organismos afectados (efecto cuantitativo) o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra.
14. **FITOTOXICIDAD:** Se refiere a tóxicos que afectan a los vegetales, efectos de toxicidad en especies vegetales sensibles, donde diversos factores edáficos pueden determinar la biodisponibilidad de un compuesto químico, y por lo tanto, la intensidad del efecto fitotóxico, tales como el contenido de materia orgánica y el pH del suelo, además del grado de solubilidad de la forma química.

15. **GERMINACIÓN:** Se genera por medio del crecimiento del embrión una vez superado el periodo de latencia y cuando las condiciones de temperatura, luz, disponibilidad de oxígeno y agua son las adecuadas se desarrolla la plántula.
16. **HIPOCÓTILO:** Porción del tallo de un embrión o de la plántula situado entre los cotiledones y la radícula.
17. ***Lactuca sativa* (LECHUGA):** Planta herbácea hortícola, propia de las regiones templadas, comestible que tiene una alta sensibilidad a la presencia de agentes extraños.
18. **NECROSIS:** Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido de la semilla, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión.
19. **PROTOCOLO:** Es un conjunto de procedimientos explícitos para un ensayo o experimento, de acuerdo con lo establecido entre las partes y descrito en un documento.
20. **RADÍCULA:** Extremo basal del eje embrionario, raíz originada en la semilla y que dará la raíz primaria.
21. **REPLICA:** Unidad de ensayo de toxicidad en la que se busca conocer la respuesta del organismo frente a un agente químico. Deben ser utilizadas concentraciones diferentes y un control.

22. **TOXICIDAD:** La toxicidad es una medida usada para medir el grado tóxico o venenoso de algunos elementos. El estudio de los venenos se conoce como toxicología. La toxicidad puede referirse al efecto de esta sobre un organismo completo, como un ser humano, una bacteria o incluso una planta, o a una subestructura, como una célula (citotoxicidad).
23. **TOXICIDAD AGUDA:** Efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayo en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo, usualmente de pocos días.
24. **TOXICIDAD CRÓNICA:** Efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia.
25. **TÓXICO:** Sustancia química que dependiendo de la concentración y tiempo de exposición produce alteraciones bioquímicas, fisiológicas, estructurales o la inhibición del organismo expuesto.

ANEXO 2.- Principales especies arsenicales detectadas en muestras biológicas y/o medioambientales.

Arsénico inorgánico	Arsenito [As(III)]	AsO_3^{-3}
	Óxido de arsénico (III)	As_2O_3
	Arseniato [As(V)]	AsO_4^{-4}
	Óxido de arsénico (V)	As_2O_5
Arsénico Orgánico	Ácido monometilarsónico [MMA(V)]	$CH_3AsO_3^{-2}$
	Ácido monometilarsenioso [MMA(III)]	$CH_3As(OH)_2$
	Ácido dimetilarsínico [DMA(V)]	$(CH_3)_2AsO_2^{-1}$
	Ácido dimetilarsenioso [DMA(III)]	$(CH_3)_2As(OH)$
	Óxido de trimetilarsina (TMAO)	$(CH_3)_3AsO$
	Ion tetrametilarsonio (TMA ⁺)	$(CH_3)_4As^+$
	Arsenocolina (AC)	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH$
	Arsenobetaina (AB)	$(CH_3)_3As^+CH_2COOH$
	Dimetilarsiniletanol	$(CH_3)_2As(O)CH_2CH_2OH$
	Ácido dimetilarsinilacético	$(CH_3)_2As(O)CH_2COOH$
	Arsenoazúcares dimetilados R: – OH – $OPO_3HCH_2CH(OH)CH_2OH$ – SO_3H – OSO_3H	
	Arsenoazúcares trimetilados R: – OSO_3^-	
Arsenolípidos R: – H (glicerofosforilarsenocolina) R: – $CO(CH_2)_nCH_3$ (fosfatidilarsenocolina)	CH_2OR CHOR $CH_2-OPO_2CH_2CH_2As^+(CH_3)_3$	

Fuente: Torres (2011)

ANEXO 3.- Preparación de la solución patrón de arseniato de sodio (NaH₂AsO₄.H₂O).

Tabla 19.- Peso molecular del NaH₂AsO₄.H₂O

Elemento	Peso molar(gr)
Na	22,9898
H ₄	1,00794
As	74,9216
O ₅	15,9994
Total	181,9402

Fuente: Tabla periódica de elementos

Se preparó una solución de **500ml de 2000 mg/L (2000 ppm)**

$$2000 \text{ ppm} = \frac{2000 \text{ mg/l}}{1000 \text{ ml}} = \frac{1000 \text{ mg/l As}}{500 \text{ ml}}$$

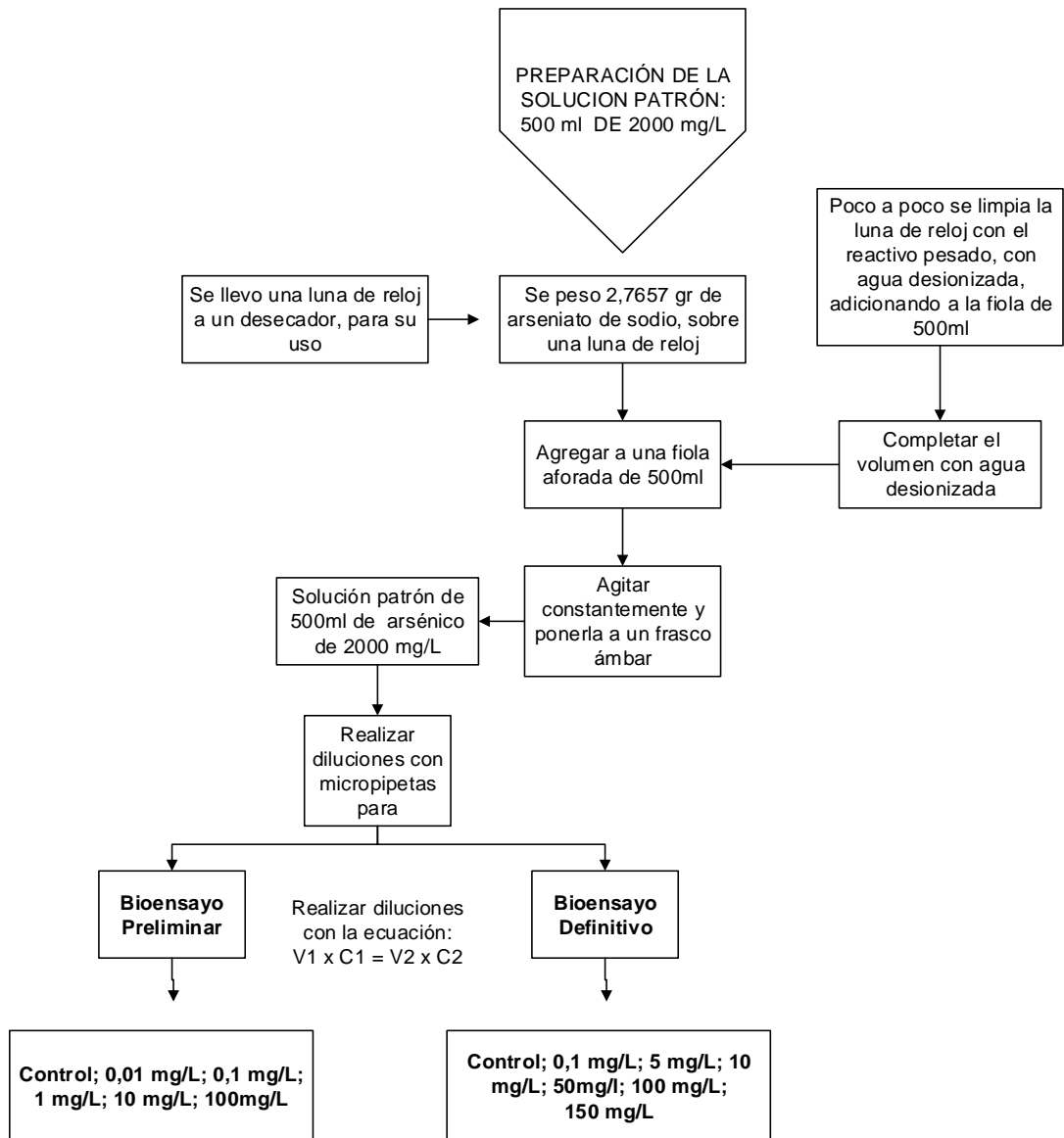
De tal manera que en:

$$\begin{aligned} 181,9402 \text{ gr reactivo} &\rightarrow 74,92 \text{ mg As} \\ X &\rightarrow 1000 \text{ mgAs} \\ X &= \frac{1000 \text{ mg/l As} \times 181,9402 \text{ gr NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}{74,92 \text{ gr As}} \\ X &= 2428,4597 \text{ mg/l} \end{aligned}$$

Dado que el reactivo tiene una pureza del 99,9% NaH₂AsO₄.H₂O, entonces:

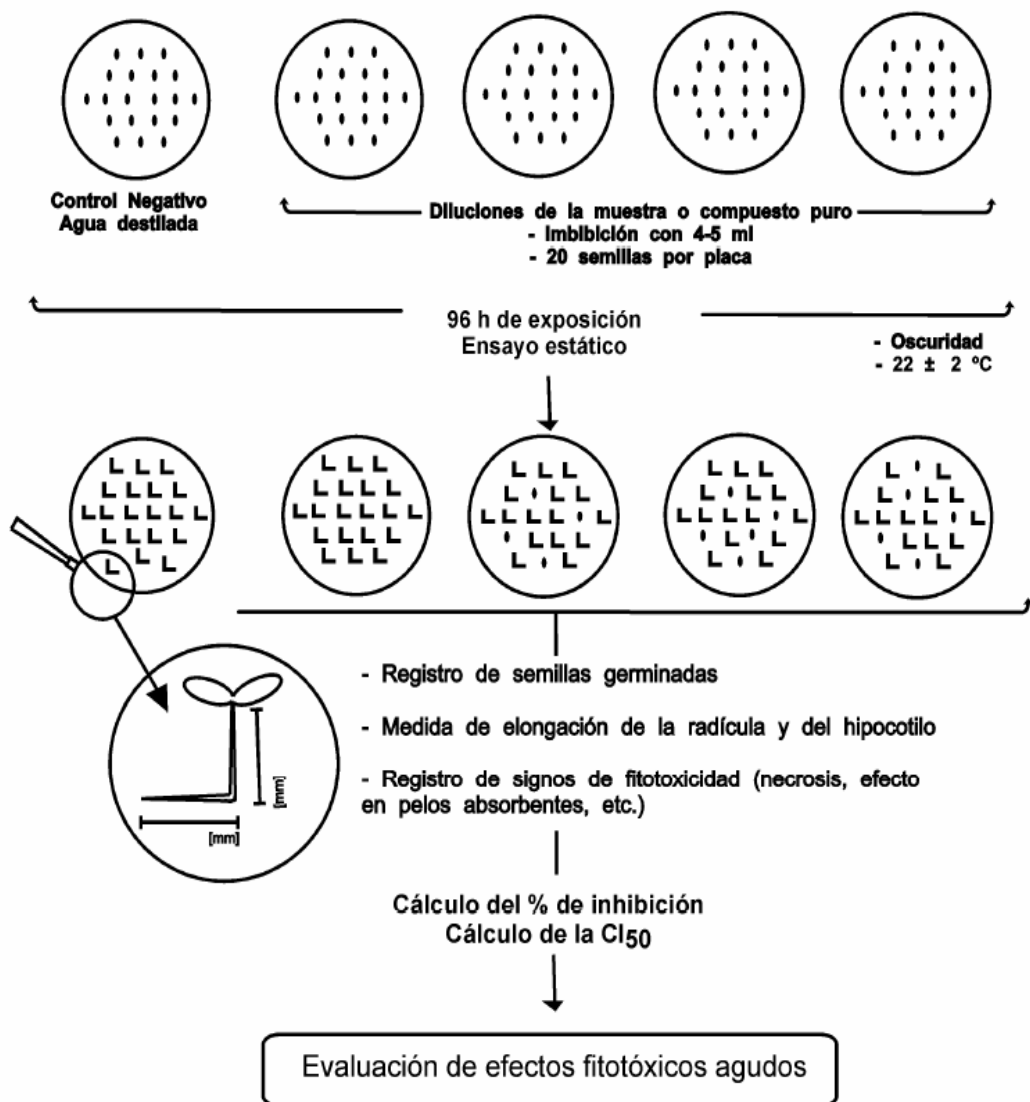
$$\begin{aligned} 100 \text{ gr reactivo} &\rightarrow 99,9 \text{ gr NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \\ X &\rightarrow 2428,4597 \text{ mg/l} \\ X &= 2430,8906 \text{ mg} = \mathbf{2,4308 \text{ gr}} \end{aligned}$$

ANEXO 4.- Preparación de las diluciones con arseniato de sodio ($\text{NaH}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).



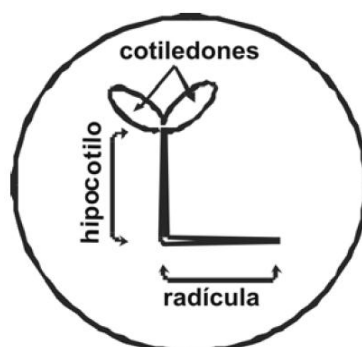
Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 5.- Protocolo de ensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* (lechuga).



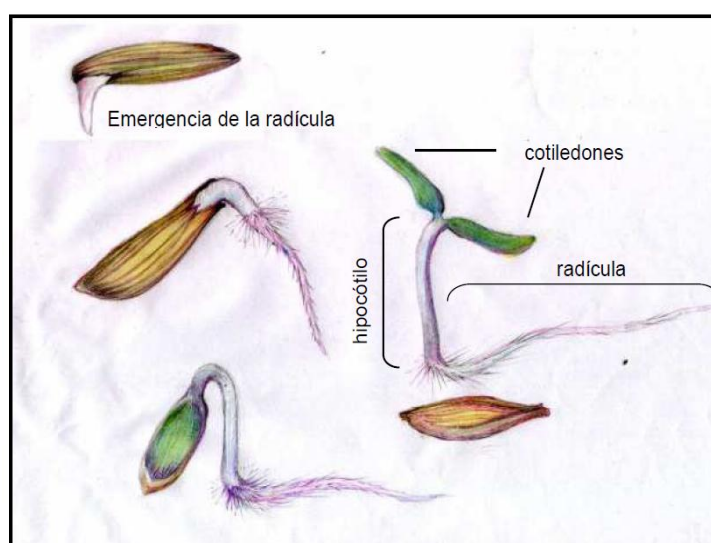
Fuente: Castillo (2004)

ANEXO 6.- Esquema de plántula de *L.satíva* al finalizar el periodo de exposición y parámetros a medir



Fuente: Castillo (2004)

ANEXO 7.- Germinación y estadios de desarrollo por los que atraviesa la semilla y la plántula de *Lactuca sativa* (lechuga) durante el ensayo de toxicidad.



Fuente: Sobrero (2010)

ANEXO 8.- Promedio de concentraciones de arsénico de los monitorios de calidad de aguas superficiales, emitido por la Autoridad Nacional el Agua del 2011 al 2014 en cuencas de la ciudad de Tacna.

Concentraciones de arsénico en cuencas (mg/L)				
Año	Cuenca Uchusuma	Cuenca Caplina	Cuenca Sama	Cuenca Locumba
2011	0,1657	0,2975	0,6527	0,7978
2012	0,1176	0,1300	0,4991	0,4776
2013	0,0961	0,0660	0,4389	0,4277
2014	-	-	0,5483	0,4912
Promedio Total	0,1265	0,1645	0,5348	0,5486

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 9.- Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para el agua en sus categorías en los dos últimos Decretos Supremos 2008 y 2015.

ESTÁNDARES NACIONALES DE CALIDAD AMBIENTAL PARA AGUA (ECA)				Und. para el arsénico (As)	Nº 002-2008-MINAM	Nº 015-2015-MINAM
					Valor	Valor
CATEGORIA I "Población y Recreación"	AGUAS SUPERFICIALES DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE AGUA POTABLE	A1	Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	mg/L	0,01	0,01
		A2	Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	mg/L	0,01	0,01
		A3	Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	mg/L	0,05	0,15
	AGUAS SUPERFICIALES DESTINADAS PARA RECREACIÓN	B1	Contacto primario	mg/L	0,01	0,01
		B2	Contacto secundario	mg/L	"	**
CATEGORIA II "Actividad Marino Costeras"	AGUA DE MAR	Sub Categoría 1	Extracción y cultivo de Moluscos	mg/L	0,05	0,05
		Sub Categoría 2	Extracción y cultivo de ostras especies hidrobiológicas	mg/L	0,05	0,05
		Sub Categoría 3	Otras actividades	mg/L	0,05	0,05
	AGUA CONTINENTAL	Sub categoría 4	Extracción y cultivo de especies hidrobiológicas	mg/L	-	0,05

Continúa...

CATEGORIA III "Riego de Vegetales y Bebida de Animales"	PARÁMETROS PARA RIEGO DE VEGETALES	Riego de cultivos de tallo Alto y Bajo	mg/L	0,05	0,1
	PARÁMETROS PARA BEBIDA DE ANIMALES	Bebida de animales	mg/L	0,1	0,2

CATEGORIA IV "Conservación del Ambiente Acuático"	LAGUNAS Y LAGOS		mg/L	0,01	0,15
	RÍOS	Costa y sierra	mg/L	0,05	0,15
		Selva	mg/L	0,05	0,15
	ECOSISTEMAS MARINO COSTERAS	Estuarios	mg/L	0,05	0,036
		Marinos	mg/L	0,05	0,036

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 10.- Imágenes de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) germinadas con concentraciones de arseniato de sodio, observadas en Laboratorio.



Imagen 1.- Semillas germinadas en el control

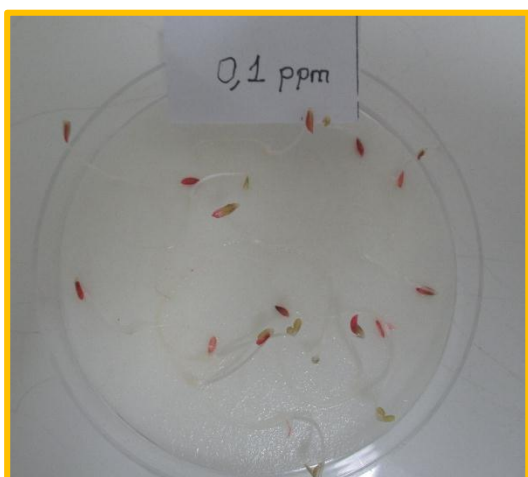


Imagen 2.- Semillas germinadas a una concentración de 0,1 ppm o mg/L



Imagen 3.- Semillas germinadas a una concentración de 5 ppm o mg/L

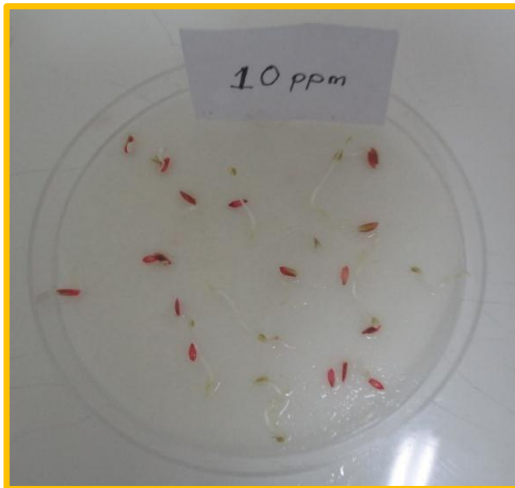


Imagen 4.- Semillas germinadas a una concentración de 10 ppm o mg/L

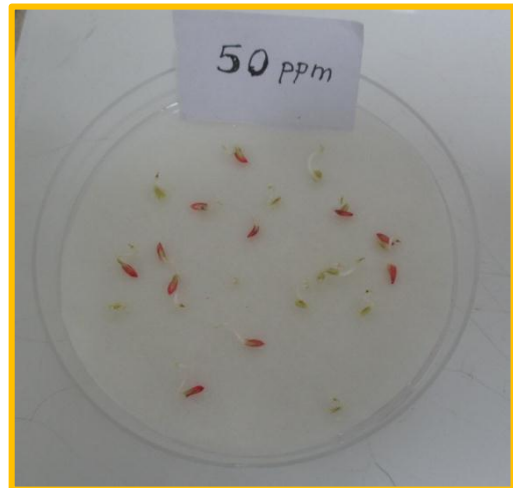


Imagen 5.- Semillas germinadas a una concentración de 50 ppm o mg/L

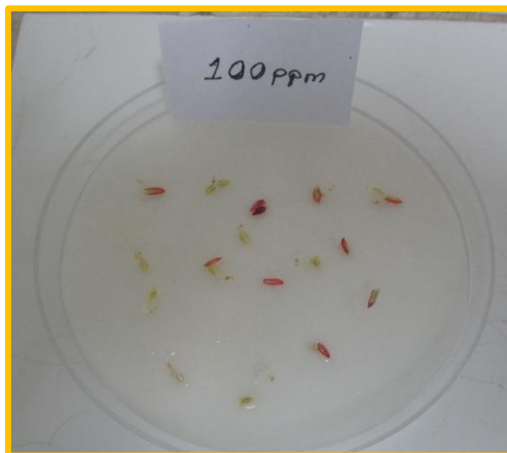


Imagen 6.- Semillas germinadas a una concentración de 100 ppm o mg/L



Imagen 7.- Semillas germinadas a una concentración de 150 ppm o mg/L

Imagen 8.- Crecimiento de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* (lechuga) sometida a seis concentraciones de arseniato de sodio respecto al control.

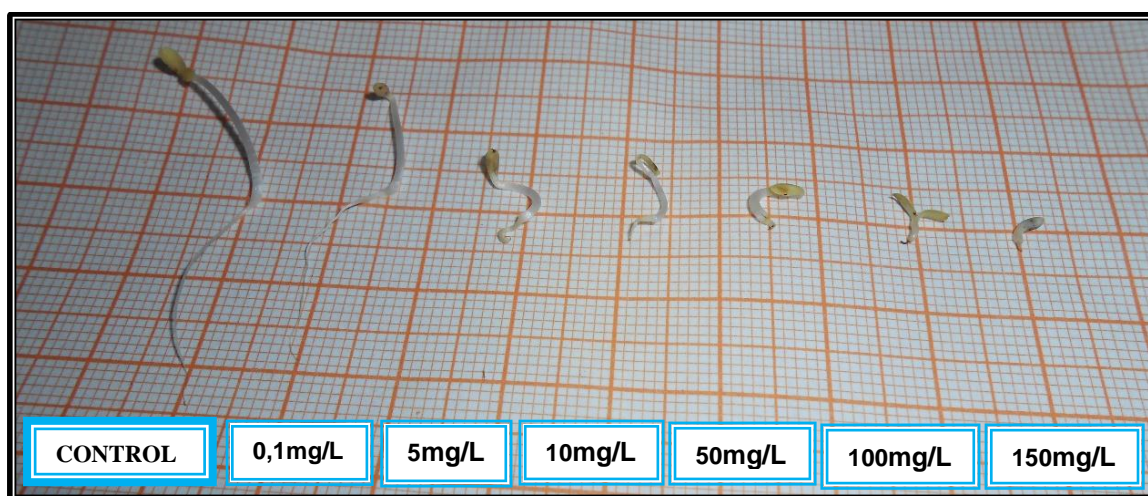
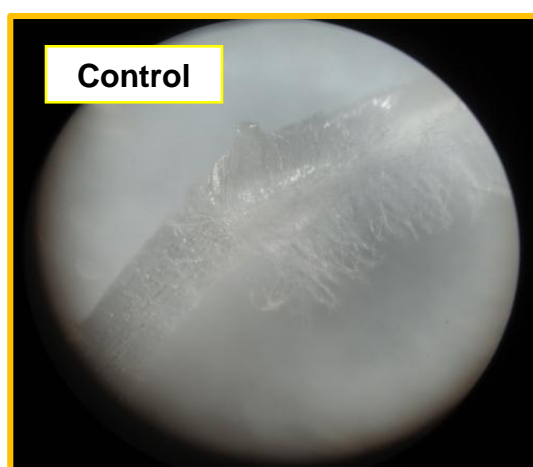
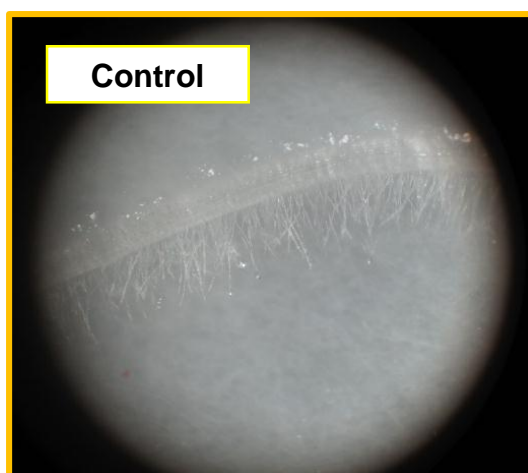
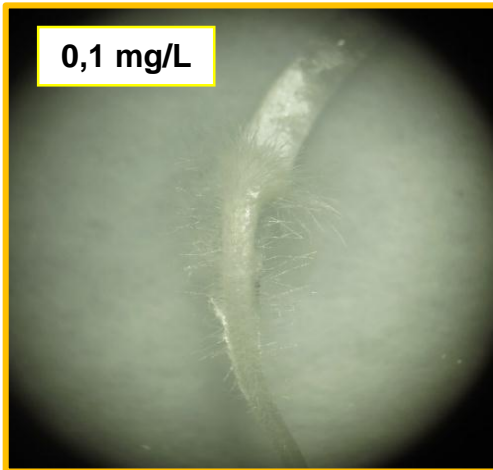


Imagen 9.- Presencia de pelos absorbentes en la radícula del control y las concentraciones de arsénico





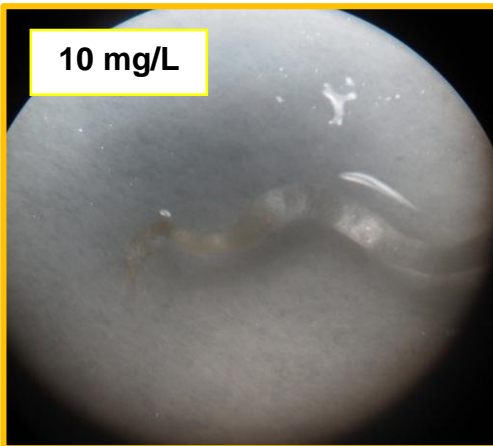
0,1 mg/L

Imagen 9.a



5 mg/L

Imagen 9.b



10 mg/L

Imagen 9.c



50 mg/L

Imagen 9.d



100 mg/L

Imagen 9.e



150 mg/L

Imagen 9.f

Imagen 10.- Plántulas de *Lactuca sativa* (lechuga) con concentraciones de 5 mg/L de arsénico

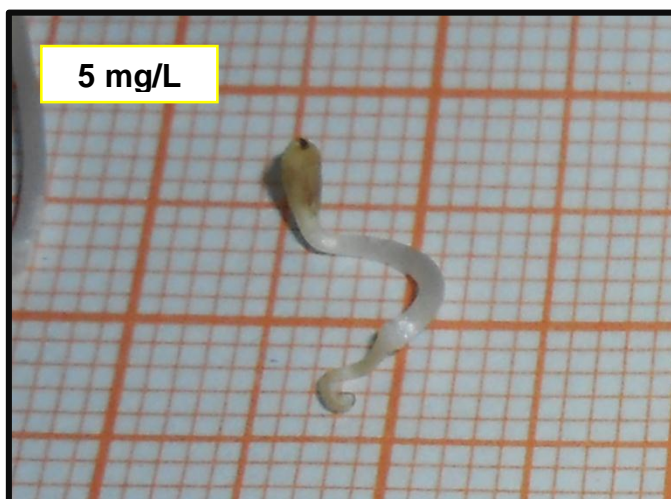


Imagen 11.- Plántula de *Lactuca sativa* (lechuga) con concentraciones de 10 mg/L de arsénico



Imagen 11

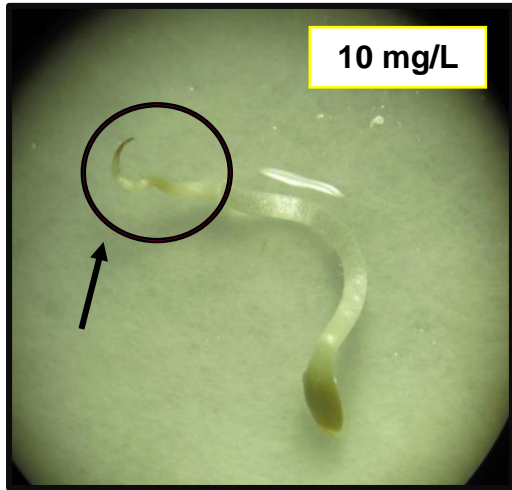


Imagen 11.a

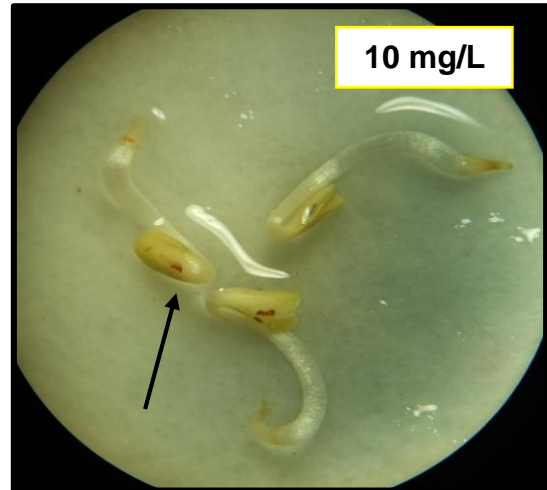


Imagen 11.b

Imagen 12.- Plántulas de *Lactuca sativa* (lechuga) con concentraciones de 50 mg/L de arsénico



Imagen 12.a

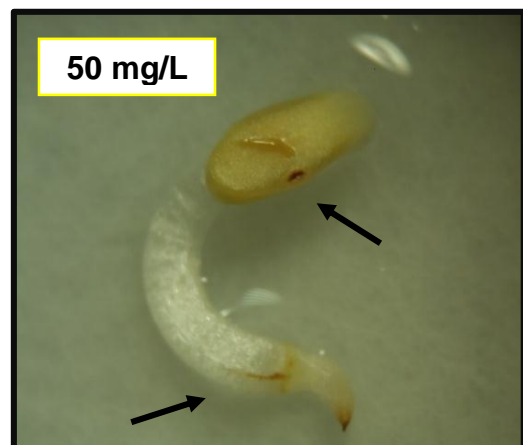


Imagen 12.b

Imagen 13.- Plántulas de *Lactuca sativa* (lechuga) con concentraciones de 100 mg/L de arsénico



Imagen 13.a



Imagen 13.b

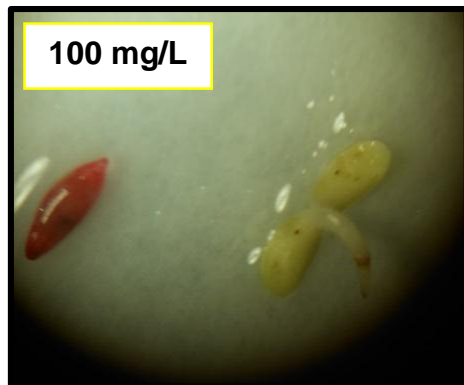


Imagen 13.c



Imagen 13.d

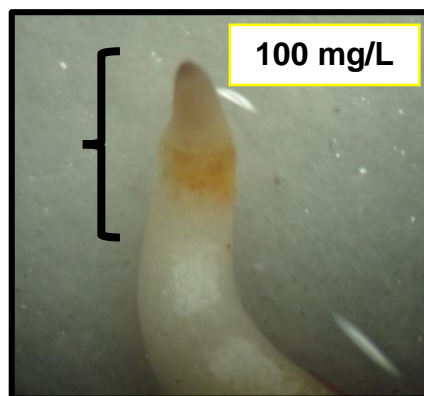


Imagen 13.e

Imagen 14.- Plántulas de *Lactuca sativa* (lechuga) con concentraciones de 150 mg/L de arsénico

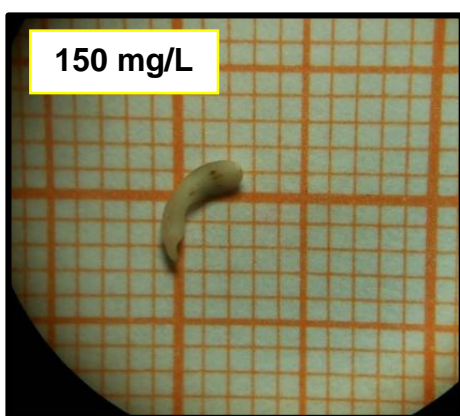


Imagen 14.a



Imagen 14.b

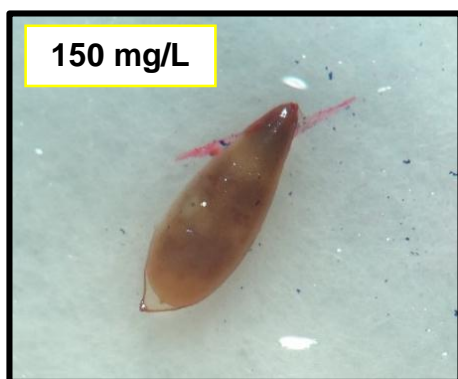


Imagen 14.c



Imagen 14.d

ANEXO 11.- Observación de la fitotoxicidad del arseniato de sodio en *L.satíva* (lechuga).



ANEXO 12.- Medición de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* (lechuga).



a. Medición de radícula



b. Medición de hipocótilo

ANEXO 13.- Resultado del porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* (lechuga) en promedio, sometidas a tratamientos (concentraciones de arseniato de sodio).

Tratamiento/ Repetición	Concentración de arseniato de sodio (mg/L)	Porcentaje de Germinación (%)
Control/1	0	90
Control/2	0	90
Control/3	0	95
Control/4	0	90
Control/5	0	95
Control/6	0	85
T1/1	0,1	90
T1/2	0,1	90
T1/3	0,1	85
T1/4	0,1	80
T1/5	0,1	85
T1/6	0,1	90
T2/1	5	55
T2/2	5	60
T2/3	5	60
T2/4	5	55
T2/5	5	60
T2/6	5	60
T3/1	10	50
T3/2	10	50
T3/3	10	55
T3/4	10	55
T3/5	10	55
T3/6	10	55
T4/1	50	55
T4/2	50	60
T4/3	50	60
T4/4	50	30
T4/5	50	60
T4/6	50	45

Continúa...

Tratamiento/ Repetición	Concentración de arseniato de sodio (mg/L)	Porcentaje de Germinación (%)
T5/1	100	55
T5/2	100	35
T5/3	100	30
T5/4	100	20
T5/5	100	20
T5/6	100	25
T6/1	150	2
T6/2	150	25
T6/3	150	15
T6/4	150	30
T6/5	150	0
T6/6	150	15

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 14.- Resultado del crecimiento de la radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* (lechuga) en promedio, sometidas a tratamientos (concentraciones de arseniato de sodio).

Tratamiento/ Repetición	Concentración de arseniato de sodio (mg/L)	Crecimiento de radícula (mm)	Crecimiento de hipocótilo (mm)
Control/1	0	3,48	1,91
Control/2	0	2,83	2,02
Control/3	0	2,99	1,88
Control/4	0	3,59	1,80
Control/5	0	3,70	1,82
Control/6	0	3,14	1,87
T1/1	0,1	2,38	1,21
T1/2	0,1	3,41	1,62
T1/3	0,1	2,41	1,21
T1/4	0,1	2,31	1,47
T1/5	0,1	3,37	1,78
T1/6	0,1	3,21	1,54
T2/1	5	0,46	0,54
T2/2	5	0,73	0,96
T2/3	5	0,58	1,10
T2/4	5	0,61	0,90
T2/5	5	1,03	1,03
T2/6	5	1,02	1,17
T3/1	10	0,30	1,06
T3/2	10	0,69	0,93
T3/3	10	0,25	1,01
T3/4	10	0,88	0,61
T3/5	10	0,48	0,76
T3/6	10	0,69	1,01

Continúa...

Tratamiento/ Repetición	Concentración de arseniato de sodio (mg/L)	Crecimiento de radícula (mm)	Crecimiento de hipocótilo (mm)
T4/1	50	0,21	0,59
T4/2	50	0,17	0,71
T4/3	50	0,14	0,75
T4/4	50	0,01	0,71
T4/5	50	0,06	0,63
T4/6	50	0,02	0,32
T5/1	100	0,11	0,46
T5/2	100	0,14	0,51
T5/3	100	0,12	0,45
T5/4	100	0,60	0,25
T5/5	100	0,03	0,32
T5/6	100	0,16	0,38
T6/1	150	0,00	0,25
T6/2	150	0,03	0,40
T6/3	150	0,00	0,32
T6/4	150	0,03	0,30
T6/5	150	0,00	0,00
T6/6	150	0,00	0,35

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 15.- Interpolación para determinar la concentración de inhibición media (CE_{50-96}).

1. Determinación de la inhibición media para el porcentaje de germinación:

$$y = 6,7409 X$$

Reemplazando al 50% de inhibición de germinación

$$50 = 6,7409 X$$

Despejando X

$$X = \frac{50}{6,7409} = 7,41740717$$

Para convertir a las unidades iniciales, se obtiene el antilogaritmo

$$2,73^{7,41740717} = 1672,53227$$

Se divide entre 100 para volver el valor a mg/L

$$1672,53227/100 = \mathbf{16,72 \text{ mg/L}}$$

2. Determinación de la inhibición media para el crecimiento de radícula:

$$y = 10,953 X$$

Reemplazando al 50% de inhibición de germinación

$$50 = 10,953 X$$

Despejando X

$$X = \frac{50}{10,953} = 4,56495937$$

Para convertir a las unidades iniciales, se obtiene el antilogaritmo

$$2,73^{4,56495937} = 96,3361733$$

Se divide entre 100 para volver el valor a mg/L

$$96,3361733/100 = \mathbf{0,96 \text{ mg/L}}$$

3. Determinación de la inhibición media para el crecimiento del hipocótilo:

$$y = 8,3084 X$$

Reemplazando al 50% de inhibición de germinación

$$50 = 8,3084 X$$

Despejando X

$$X = \frac{50}{8,3084} = 6,01800587$$

Para convertir a las unidades iniciales, se obtiene el antilogaritmo

$$2,73^{6,01800587} = 412,323623$$

Se divide entre 100 para volver el valor a mg/L

$$412,323623/100 = \mathbf{4,1 \text{ mg/L}}$$

ANEXO 16.- Formato de recolección de datos de la medición realizadas a la radícula e hipocotilo de *Lactuca sativa* (lechuga).

RECOLECCIÓN DE DATOS						
Concentración:				Fecha de siembra:		
				Fecha de medición :		
N° de semillas	REPLICA I		REPLICA II		REPLICA III	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
Promedio						
% de Germinación						

Fuente: Elaboración propia



Bach. Silvia Yovana Huanca Arocutipa
TESISTA



Dr. César Julio Cáceda Quiroz
ASESOR