

Bioensayo de toxicidad aguda en tres biomodelos utilizando compuestos de referencia

Castañedo Z.A^{1*}, Águila E¹, Marrero O¹, Meneses-Marcel A¹, Sifontes S¹, Seijo M¹, Santana A¹.

¹ Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

Resumen: Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología. Como cualquier instrumento analítico, requieren ser calibrados frente a un patrón, con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar en estas pruebas. Para dar cumplimiento a esta premisa se procedió a la evaluación de la toxicidad aguda de dos tóxicos de referencia en tres biomodelos representativos del ecosistema: *Artemia* sp., *Physa cubensis* y semillas de *Lactuca sativa*. Para determinar la toxicidad sobre los biomodelos se emplearon dos patrones: dicromato de potasio y sulfato de cobre. En ambos casos se preparó una solución madre y a partir de ella se realizaron diluciones seriadas, estableciéndose 3 réplicas por tratamiento. Para el control negativo se utilizó agua según las condiciones del hábitat de cada especie. El estudio fue realizado a temperatura y humedad controladas. Se observó para cada experimento la mortalidad como variable principal y se calculó la concentración letal media (CL₅₀). Se apreció un decrecimiento de la mortalidad a medida que disminuyó la concentración de cada tóxico empleado. Se concluyó que el dicromato de potasio y el sulfato de cobre se pueden utilizar como patrones en la calibración de ensayos ecotoxicológicos de los biomodelos empleados.

Palabras clave: Bioensayos; dicromato de potasio; sulfato de cobre; ecotoxicología.

Abstract: *Acute toxicity bioassay in three biomodels using reference compounds.*

Similar to any analytical instrument, bioassays used in the field of ecotoxicology should be calibrated against a standard for analytical quality control purposes of the test organisms. To this end, the acute toxicity of two reference toxicants was evaluated in three biomodels representative of the ecosystem: *Artemia* sp., *Physa cubensis* and *Lactuca sativa* seeds. In the same, two patterns were used: potassium dichromate and copper sulphate. In both cases, a stock solution was prepared and serial dilutions of it, establishing 3 replicates per treatment. The control used consisted of water according to the habitat conditions of each species. The study was performed at controlled temperature and humidity. Were calculated mortality, expressed as LC₅₀, for each experiment. A decrease in mortality was observed as the concentration of each toxicant decreased. It is concluded that potassium dichromate and copper sulphate can be used as standards in the calibration of ecotoxicological assays of the considered biomodels.

Key words: Bioassays; copper sulfate; reference toxicant; potassium dichromate.

Introducción

Las actividades antropogénicas han generado una gran variedad de contaminantes, y sus efectos dependen de la concentración en la que se encuentren las sustancias, su persistencia y biodisponibilidad, causando desde efectos no letales hasta la muerte de poblaciones enteras (Ramírez y Mendoza, 2008). La investigación de los efectos adversos que estos provocan sobre los organismos se inicia en la primera mitad del pasado siglo, a través del desarrollo de estudios para determinar la relación causa-efecto ante la presencia de agentes químicos y sus efectos biológicos. En la actualidad, los ensayos ecotoxicológicos se realizan previos a la liberación de los productos al ambiente, ocupándose del estudio del efecto y destino de agentes tóxicos a los ecosistemas acuáticos y terrestres. Estas pruebas de

toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones con la concentración–respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en el laboratorio (Silva et al., 2003).

Los bioensayos de toxicidad, como cualquier instrumento analítico, requieren ser calibrados frente a un patrón o tóxico de referencia, que constituye una sustancia orgánica o inorgánica utilizada en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar. Para ello, en la etapa inicial del montaje de un método de prueba, debe seleccionarse un compuesto soluble, de pureza igual o mayor al 99%, al cual se le realicen pruebas de toxicidad para una especie determinada, con el fin de establecer el intervalo de concentración del compuesto seleccionado que produce el efecto esperado. Una vez definido el patrón de la relación dosis–respuesta, este puede ser empleado como tóxico de referencia. En la literatura se mencionan varios compuestos que pueden emplearse con este fin: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio (CdCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) (Castillo, 2004).

La principal utilidad de los patrones de referencia consiste en establecer la sensibilidad frente a las especies bioindicadoras y la reproducibilidad del experimento, con el objetivo de asegurar que la respuesta al agente tóxico, se deba al efecto de este y no a variaciones en la sensibilidad de los organismos (Silva et al., 2003).

Los estudios ecotoxicológicos han demostrado que las distintas especies de organismos presentan un amplio rango de sensibilidades a una extensa diversidad de los contaminantes ambientales, lo que hace recomendable utilizar una batería de especies distintas para evaluar la toxicidad. Para que las pruebas puedan constituirse en una técnica de evaluación aceptada, para los organismos seleccionados, debe conocerse su biología, tener factibilidad de mantenerse *in vitro*, presentar alta sensibilidad a los tóxicos y ser factible la reproducibilidad de los ensayos (Silva et al., 2007). Los tres biomodelos seleccionados son representativos de ambientes marinos, dulceacuáticos y terrestres, vulnerables a la contaminación; además, cumplen con los requisitos básicos para ser empleados en la ecotoxicología: rápido desarrollo, alta fecundidad, fácil manejo y permiten la administración directa de las sustancias de ensayos en los medios donde se desarrollan.

Cuba es uno de los sitios de mayor riqueza de moluscos en el mundo, especialmente de moluscos terrestres (Vázquez y Perera, 2010). *Physa cubensis* es una especie autóctona y representativa de diversas fuentes acuáticas lénticas, por lo que se propone para la realización de ensayos ecotoxicológicos como un organismo bioindicador ambiental.

Teniendo en cuenta los criterios anteriores, se proyecta como objetivo evaluar la ecotoxicidad aguda en los biomodelos *Artemia* sp., *Physa cubensis* y semillas de *Lactuca sativa* del dicromato de potasio y sulfato de cobre como compuestos de referencias.

Materiales y métodos

Los estudios de toxicidad se realizaron en los laboratorios de Toxicología y Ecotoxicología del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, teniendo en cuenta los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico, de Seguridad Sanitaria y Medioambiental (MINSAP, 2004).

Tóxicos de referencias

El dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) suministrado por Panreac SA. (lote: 139900671) y el sulfato de cobre (CuSO₄) por Merck (lote:

*e-mail: zoec@uclv.cu

A866490531); ambos de grado analítico, fueron los compuestos químicos empleados en los ensayos.

Según los criterios de la Environmental Protection Agency (EPA) y de las experiencias investigativas reportadas en la literatura, se realizaron ensayos preliminares para determinar las concentraciones definitivas a emplear en el estudio, las cuales variaron según el biomodelo en dependencia de la sensibilidad obtenida. De esta forma, el dicromato de potasio se evaluó a partir de 129 mg/L, 9 mg/L y 0,1 mg/L y el sulfato de cobre comenzó en 0,011 mg/L, 10 mg/L y 1 mg/L, en ambos casos para *Physa cubensis*, *Artemia* sp y *Lactuca sativa*, respectivamente. A partir de estas concentraciones iniciales se realizaron cuatro diluciones decrecientes, empleando los factores de dilución (ecuación 1.1) que se definen en la Tabla 1.

$$FD = \frac{n-1}{n} \sqrt[n]{CM/cm} \quad (1.1)$$

Donde: *FD* = Factor de Dilución

CM = Concentración Mayor

cm = concentración menor

n = número de diluciones.

Tabla 1. Concentraciones iniciales de tóxicos de referencia empleadas en el estudio y diluciones utilizadas para cada especie.

Biomodelo	Dicromato de Potasio $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)	Sulfato de Cobre $CuSO_4$ (mg/L)	Factor de dilución
			$K_2Cr_2O_7$ $CuSO_4$
<i>Physa cubensis</i>	129	0,011	1:1,67 1:2,135
<i>Artemia</i> sp	9	10	1:10 1:10
<i>Lactuca sativa</i>	0,1	1	1:3,16 1:10

Todos los tóxicos de referencia fueron disueltos en el agua de mantenimiento para cada especie: agua de mar artificial (AMA) para *Artemia* sp, agua destilada para *Lactuca sativa* y agua de cloración para *P. cubensis* con el fin de obtener las concentraciones iniciales, a partir de las cuales se realizaron las diluciones seriadas para cada patrón. Se determinaron las características químico-físicas de estas, según establece la American Public Health Association (Rice et al., 2017).

Ensayo de toxicidad aguda en *Physa cubensis*

Selección del biomodelo

La selección de la especie se realizó según métodos taxonómicos de reconocimiento somático y de la concha. Para la ejecución de la prueba, se utilizaron juveniles de aproximadamente 72 h de eclosionados. Todos los organismos provenían del mismo lote con buen estado de salud, similar tamaño y edad.

Procedimiento del ensayo de toxicidad

El ensayo se desarrolló según lo establecido por las guías EPA (EPAOPPTS 1996b, 1996c). Se conformaron aleatoriamente cinco grupos experimentales con tres réplicas cada uno. Los moluscos se distribuyeron de forma aleatoria en número de 10 individuos en vasos de polietileno de 250 mL de capacidad, que contenían 15 mL de la solución a ensayar, manteniéndose en régimen estático durante 96 h, sin renovación de flujo. Se observó el comportamiento de la mortalidad durante las cuatro primeras horas y a intervalos de 24 h hasta completar el tiempo de estudio, registrándose las muertes y los efectos subletales (desadherencia y desprendimiento cefálico). Para la discriminación de la mortalidad se usó el criterio propuesto por

Iannacone et al., (2002), considerándose muerto el individuo incapaz de realizar algún tipo de movimiento en la placa de recuento, como mover el pie, la concha o los tentáculos cefálicos durante 15 segundos de observación al estereoscopio.

Condiciones ambientales y alimentación

El ensayo se realizó en un ambiente controlado (Temperatura: $23 \pm 2^\circ C$) e iluminación artificial con ciclos luz-oscuridad: 12/12 horas.

El alimento consistió en una suspensión, triturada y tamizada, (0.045mm) de pienso para peces al 4 %, producido y certificado por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba. Se añadieron 100 µL por recipiente.

Ensayo de toxicidad aguda en *Artemia* sp.

Selección del biomodelo

Las larvas de *Artemia* sp. se obtuvieron a partir de huevos desecados adquiridos de Argent (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA), desenquistados durante 24 horas en Agua de Mar Artificial (AMA).

Preparación de Agua de Mar Artificial

El AMA se preparó a partir de una mezcla de sales según la fórmula de Dietrich & Kalle y descrita por González y Aportela (2001): 23 g de NaCl, 11g de $MgCl_2 \times 6H_2O$, 4g de Na_2SO_4 , 1,3g de $CaCl_2 \times 2H_2O$ y 0,7 de KCl. Dichas sales se disolvieron en un litro de agua destilada y se ajustó el pH de la solución a 9,0 con Na_2CO_3 , alcanzando una concentración del 35 % y una densidad de 1,022-1,024 g/L. El agua reconstituida fue sometida a un sistema de aireación durante 24 horas, para conseguir las condiciones apropiadas de oxígeno y dióxido de carbono.

Procedimiento del ensayo de toxicidad

Una vez obtenidas las larvas de una cohorte de 24 h de eclosión, se procede a la ejecución del ensayo según las guías EPA (EPAOPPTS 1996b, 1996c); González y Aportela (2001). Se conformaron cinco grupos experimentales, asignándose al azar 30 larvas, distribuidas en tres réplicas de al menos 10 individuos cada uno. Para ello, el cultivo de eclosión se vertió en una placa Petri y se pipetearon 100µL. Este volumen se adicionó a las placas del ensayo que contenían 9,9 mL de AMA y producto en estudio, para un volumen final de ensayo de 10 mL. Las larvas se observaron mediante lupa o microscopio estereoscópico a las 24-48 horas, registrándose las muertes, considerándose muerto, el individuo incapaz de moverse por 10 segundos.

Condiciones ambientales y alimentación

El ensayo se llevó a cabo en un ambiente controlado (Temperatura: $25 \pm 2^\circ C$). El proceso óptimo de desenquistamiento se mantuvo con una intensidad de luz de 100 lux y oxigenación controlada. La exposición a la solución de ensayo se realizó en oscuridad. Las larvas de *Artemia* sp. no recibieron alimento durante el experimento.

Ensayo de toxicidad aguda en Semillas de *Lactuca sativa*

Selección del biomodelo

Se emplearon semillas de *Lactuca sativa* suministradas por la Empresa Provincial de Semillas Varias de Villa Clara, Cuba. Las mismas fueron certificadas por el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, con viabilidad probada mayor del 95% y libre de plaguicidas. Las semillas se agruparon por tamaño y morfología, escogiéndose el grupo más uniforme para el ensayo.

Procedimiento del ensayo de toxicidad

La evaluación del efecto fitotóxico de las sustancias de referencias en *Lactuca sativa*, se desarrolló según las metodologías de la EPA (EPAOPPTS 1996a, EPAOCSP 2012a, 2012b). Se realizaron cinco grupos experimentales, con tres réplicas cada uno. A cada réplica se le asignaron aleatoriamente 20 semillas (60 por concentración), siendo

ubicadas en placas de Petri de 11 cm de diámetro. Se le adicionaron 4 mL/placa de los tóxicos de referencia, según la concentración correspondiente a cada grupo, manteniéndose en régimen estático durante 120 h. Se contabilizaron las semillas germinadas y se midió el largo de la raíz, tomando como referencia la distancia desde el hipocotilo hasta el extremo distal de la misma.

Condiciones ambientales

Las semillas se mantuvieron en total oscuridad empleando una manta de polietileno durante el tiempo del estudio. La humedad del ambiente se garantizó colocando vasos de precipitados con agua y midiendo la misma con un psicrómetro, para mantenerla en un rango entre 70 y 80%. La temperatura del local se mantuvo en un rango de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

El control negativo para los tres biomodelos ensayados consistió en el agua requerida para la cría y mantenimiento de cada espécimen. Cada recipiente se identificó mediante un código para realizar las evaluaciones a ciegas. El cálculo del porcentaje de mortalidad se realizó teniendo en cuenta la ecuación 1.2:

$$\%M_T = 100 * \frac{\text{Total muertos}}{(\text{vivos} + \text{muertos})} \quad (1.2)$$

Donde:

$\%M_T$ = Porcentaje de mortalidad

La relación entre la variable anterior y la concentración fue utilizada para determinar la concentración letal media (CL_{50}) en cada biomodelo y además se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) sobre la elongación radicular de *Lactuca sativa*. En todos los casos se empleó la ecuación (1.3) de ajuste de curva sigmoide (Serrano, 2003):

$$E(\%) = \frac{100 * C^n}{(C^n + CE_{50}^n)} \quad (1.3)$$

Donde: $E(\%)$ = efecto (inhibidor o letal) observado a una concentración (C) dada

CE_{50} = concentración estimada que produce un efecto del 50%

n = pendiente de la región central de la curva sigmoide

El procesamiento de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico STATISTICA.v10.0.1011.

Resultados

Los ensayos de toxicidad en los tres biomodelos se consideraron válidos al no existir mortalidad en los grupos controles para *Physa cubensis* y *Artemia* sp. En *Lactuca sativa* fue del 10%, valor aceptado en las normas para la realización de estos ensayos.

Ensayo de toxicidad aguda en *Physa cubensis*

De manera general, se observó una relación concentración-efecto proporcional al término del período de exposición (96 horas). La CL_{50} del $K_2Cr_2O_7$ frente al molusco *P. cubensis* fue de $44,56 \pm 38,7-50,3$ mg/L (Gráfico 1). Además, no se observaron efectos subletales en los individuos que se mantuvieron vivos durante el estudio.

En la determinación del efecto tóxico frente a $CuSO_4$ se obtuvo una CL_{50} de $0,0014 \pm 0,00136-0,00146$ mg/L (Gráfico 2).

Ensayo de toxicidad aguda en *Artemia* sp

Los valores de la CL_{50} del $K_2Cr_2O_7$ (Gráfico 3) correspondieron en *Artemia* sp. a $0,37 \pm 0,31-0,43$ mg/L y para el $CuSO_4$ (Gráfico 4) en $0,023 \pm 0,012-0,058$ mg/L. Además, no se presenciaron efectos letales durante el tiempo de exposición en ninguna de las concentraciones evaluadas.

Ensayo de toxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa*

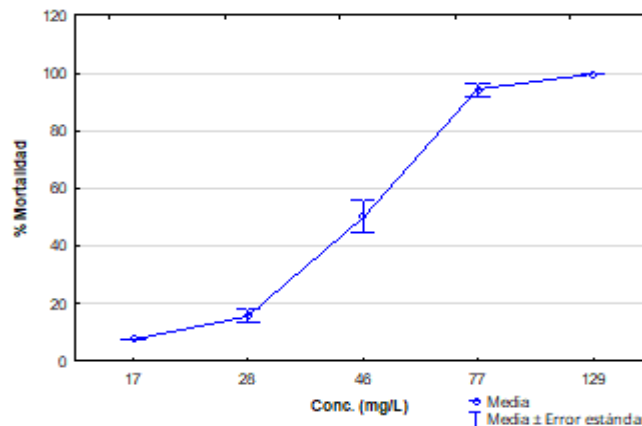


Figura 1: Comportamiento de la mortalidad de *Physa cubensis* expuestos al dicromato de potasio.

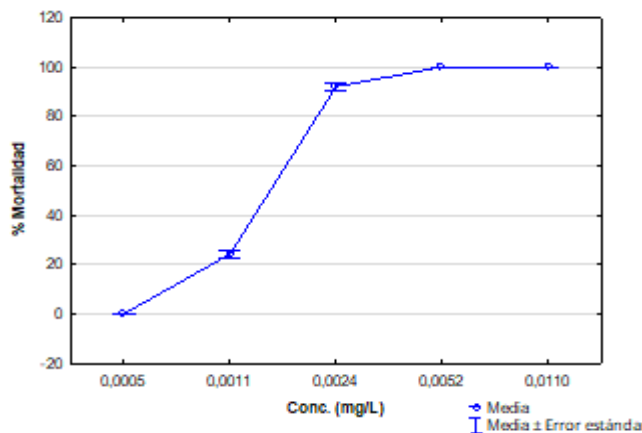


Figura 2: Comportamiento de la mortalidad de *Physa cubensis* frente al sulfato de cobre.

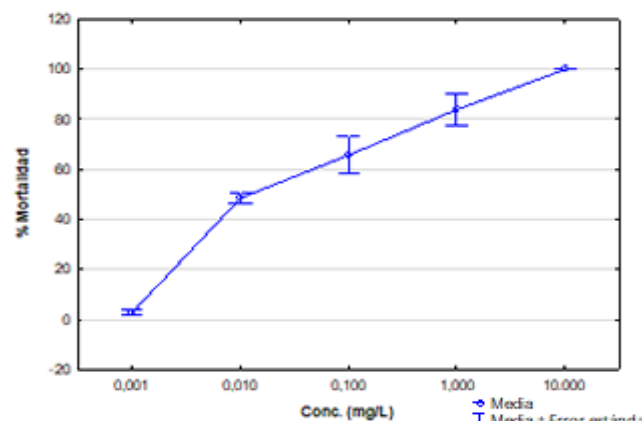


Figura 3: Efecto del dicromato de potasio en la mortalidad de *Artemia* sp.

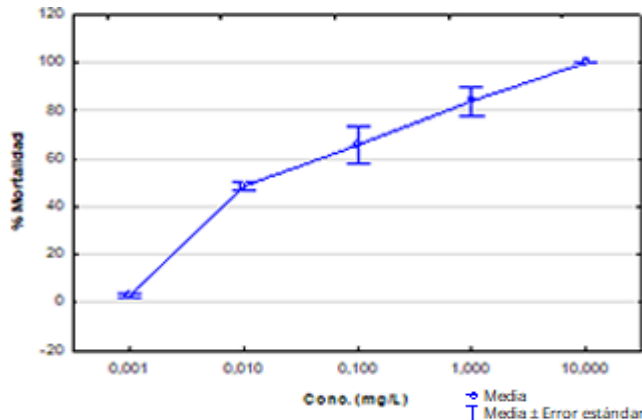


Figura 4: Efecto del Sulfato de cobre en la mortalidad de *Artemia* sp.

La germinación de las semillas de *Lactuca sativa* utilizadas como control fue de un 90 %, considerándose un valor aceptable en el tiempo establecido para el cultivo de este vegetal en condiciones de laboratorio. Las plántulas obtenidas se encontraron saludables y con un crecimiento normal durante todo el estudio.

En las semillas expuestas al $K_2Cr_2O_7$ se observó una disminución del porcentaje de inhibición de la germinación y de la elongación de la raíz a medida que disminuyó la concentración del tóxico (Gráfico 5).

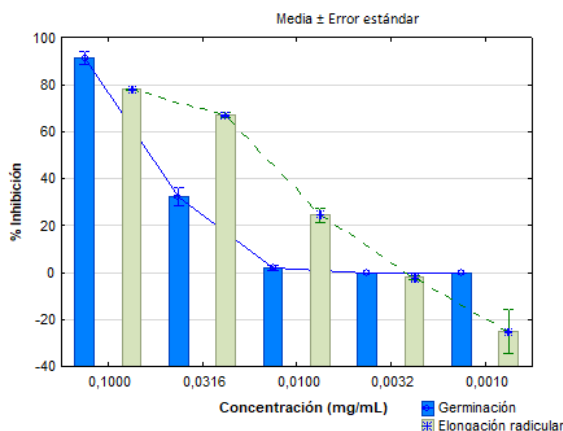


Figura 5: Resultado del ensayo de *Lactuca sativa* en dicromato de potasio.

En la concentración máxima evaluada (0,1 mg/L), las plántulas que germinaron no alcanzaron 0,5 mm de longitud radicular, con presentación de coloración carmelita oscura en el extremo distal (necrosis). En la dilución siguiente (0,0316 mg/L), el efecto de la inhibición de la germinación, fue menos marcado. El valor de CL_{50} correspondió a $0,0416 \pm 0,0413 - 0,0419$ mg/L y el de la CI_{50} de la elongación radicular fue de $0,023 \pm 0,004 - 0,05$ mg/L, pudiéndose apreciar que a concentraciones mayores del tóxico se produce una mayor afectación al crecimiento de la raíz; sin embargo, en las concentraciones menores (0,0032 y 0,001 mg/L) hubo mayor crecimiento de la raíz con respecto al grupo control, datos no mostrados (Gráfico 5).

Este biomodelo mostró un resultado similar frente al $CuSO_4$. El valor de CL_{50} para la germinación correspondió a $0,35 \pm 0,017 - 0,05$ mg/L y para la elongación de la raíz de $0,015 \pm 0,009 - 0,04$ mg/L.

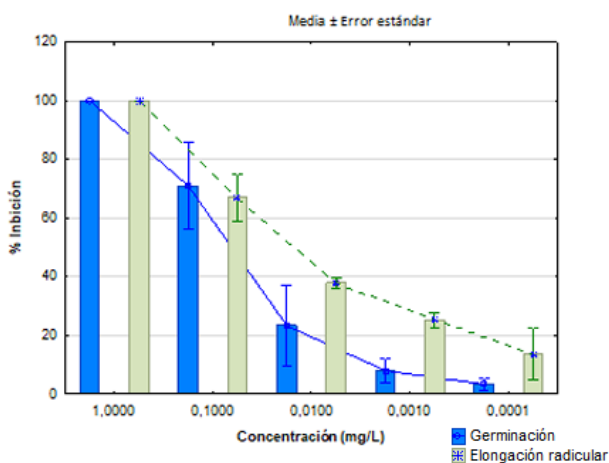


Figura 6: Resultado del ensayo de *Lactuca sativa* en sulfato de cobre.

Discusión

La evaluación ecotoxicológica es de extrema importancia en el control, reglamentación y clasificación de las sustancias tóxicas en cuanto a su potencial de riesgo ambiental. En las etapas iniciales del proceso de análisis de riesgo, para la identificación de los efectos y la evaluación de la relación de la dosis-respuesta, se utilizan

indicadores ambientales o biomodelos (Dos Santos et al., 2015). Como aspecto inicial, resulta necesario determinar la calidad de estos mediante la evaluación de la sensibilidad relativa, utilizando patrones de referencia. Teniendo en cuenta esta premisa, se emplearon una especie autótrofa o productora (planta terrestre) y dos organismos consumidores primarios: molusco (*Physa cubensis*) y crustáceo (*Artemia* sp.).

Dicromato de potasio

Physa cubensis es la especie de molusco más abundante de los reservorios naturales de agua dulce en Cuba (Hurtado y Pérez, 2017), y tienen una función trófica de importancia en la dinámica de los ecosistemas acuáticos (Iannacone et al., 2002). Por su parte, Alfonso et al., (2010) utilizaron esta especie como herramienta para la evaluación de riesgos ambientales. No obstante, en la literatura no se reportan datos sobre la evaluación de la sensibilidad de esta especie frente a patrones de referencia. Algunos autores, han determinado el efecto del $K_2Cr_2O_7$ frente a otras especies de moluscos, correspondiendo la CL_{50} a 20,4 mg/L, al ser expuesto el bivalvo dulceacuícola, *Diplodon chilensis* a este patrón de referencia (Silva et al., 2007).

Por el contrario, para el biomodelo de *Artemia salina*, sí aparecen varios reportes en la literatura internacional. Carballo et al., (2003) obtuvieron el valor de CL_{50} del $K_2Cr_2O_7$ frente a *Artemia* sp. en 8,41 mg/L, así como Iannacone et al., (2016) reportan la CL_{50} en el intervalo entre 8 a 15 mg/L, valores superiores al nuestro (0,37 mg/L); sin embargo, este se encuentra en el rango establecido por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente para ensayos agudos en invertebrados acuáticos, (0,067-59,9 mg/L) (UNEP, 1988).

De otro lado, en la evaluación del impacto de los contaminantes en las plantas terrestres, es importante destacar que durante las etapas de desarrollo fenológico, desde la germinación hasta 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. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye un indicador representativo para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. Duarte, (2009) obtuvo que la concentración de 35,43 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ produce el 50% de inhibición de la elongación de la radícula y del hipocotilo de la semilla expuesta. Además, a concentraciones altas como la de 100 y 80 mg/L, los niveles de germinación se encontraban entre el 8% y 24,16 %, los cuales son considerados como muy bajos; por lo que la acción sobre las semillas genera una inhibición alta. Alonso y López, (2015) obtuvieron una CE_{50} de 18,94 mg/L al evaluar este tóxico frente a *Lactuca sativa*. Todos estos autores encontraron concentraciones tóxicas mayores que las determinadas en el presente estudio (0,023 mg/L), lo que demuestra que, bajo nuestras condiciones de ensayo, este biomodelo muestra una mayor sensibilidad.

Sulfato de cobre

En *P. cubensis* no se reportan estudios de toxicidad aguda frente a $CuSO_4$; sin embargo, los bajos valores de CL_{50} obtenidos (0,0014 mg/L) corroboran las propiedades moluscicidas de este compuesto (Nordberg, 2012). Investigaciones realizadas a organismos acuáticos coinciden con dicha toxicidad. Zúñiga et al., (2003) obtuvieron valores de CL_{50} (0,12-0,49 mg/L) al exponer cuatro especies de moluscos marinos a sales de cobre. Además este compuesto es clasificado en el Manual de Plaguicidas de Centroamérica como “muy tóxico para organismos acuáticos” (Cruz et al., 2010). Al mostrar esta alta sensibilidad, el biomodelo propuesto puede ser empleado para la evaluación ecotoxicológica de productos químicos que se van a verter al ambiente.

Respecto al crustáceo (*Artemia* sp.), expuesto a $CuSO_4$, (Velasco, 2016), observaron que la mayor mortalidad se produjo en la concentración de 2 mg/L, que representaba la mayor concentración evaluada. Los valores de CL_{50} se encontraron en el rango entre 0,25 a

0,5 mg/L, valores superiores a los obtenidos en este estudio (0,023 mg/L).

El cobre también es un micronutriente esencial para el desarrollo de las plantas, encontrándose habitualmente en el suelo en forma Cu^{2+} a una concentración promedio de 6 mg/L y contribuye como activador enzimático incrementando el contenido de azúcares; no obstante, a concentraciones superiores puede presentar efectos adversos. Alonso y López (2015) al evaluar el efecto de metales pesados sobre la especie *Lactuca sativa*, obtuvieron una CE_{50} para el CuSO_4 de 31,70 mg/L (20,546–46,518); de esta cantidad, 12,56 mg/L corresponde a Cu^{+2} . Otros autores reportan valores de 4,11 mg/L de este tóxico para *L. sativa* (Duarte, 2009). Estos resultados son superiores a los obtenidos en las condiciones del estudio (0,015 mg/L) y las diferencias podrían deberse a la sensibilidad de cada especie y a las condiciones ambientales en las que se desarrolló cada estudio.

De forma general, con los resultados expuestos en este trabajo se puede concluir que los especímenes, bajo las condiciones estudiadas, constituyen biomodelos adecuados para ensayos ecotoxicológicos, al demostrar rangos de sensibilidad similares a los reportados en la literatura.

Conclusiones

El CuSO_4 y el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ pueden ser utilizados como compuestos de referencia para evaluar el efecto ecotoxicológico de productos químicos en los biomodelos *Artemia* sp., *Physa cubensis* y semillas de *Lactuca sativa*.

Bibliografía

- Alfonso D, Pérez C, Morales A, Valera Z, Meneses A. Evaluación ecotoxicológica de detergentes comerciales y naturales, como criterio de contaminación ambiental. REDVET. [Revista Electrónica de Veterinaria en línea] 2010 marzo [acceso 27 de junio de 2018]; 11(3B): 1-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613140045>
- Alonso FS, López T. Efectos tóxicos agudos de metales pesados sobre el crecimiento radicular de *Lactuca sativa*. Rep. cient. FACEN. 2015; 6 (1), 21-29.
- Carballo O, Arencibia-Carballo G, Molledato MI, González C, Triana G, Gattorno NM. Bioensayo de toxicidad con *Artemia franciscana* (Crustacea-Branchiopoda) en extractos de sedimento superficial del golfo de Guacanayabo, Cuba. Retel [revista de toxicología en línea], 2003 marzo 12- octubre 12. [Acceso: 25 de junio de 2018]; 38: 32-50. Disponible en: http://www.sertox.com.ar/img/item_full/38003.pdf
- Castillo G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México (ed.), IMTA. 2004. p.127-140.
- Cruz E, Bravo V, Ramírez F. Manual de plaguicida de Centroamérica. [UNA]. Costa Rica: Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas Universidad Nacional Heredia; 2010 [acceso 29 de enero del 2019]. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/bas-e-de-datos-menu/500-sulfato-de-cobre>.
- Dos Santos J, Barros I, Carvalho L, Jovita N, Nonata R. Principios bioéticos aplicados a los estudios ecotoxicológicos acuáticos. Rev. bioét. (Impr.). 2015; 23 (2), 416-26.
- Duarte D. Determinación de la concentración de inhibición media (CE_{50}) de cobre y níquel para la semilla *Lactuca sativa* mediante ensayos de toxicidad. Universidad de la Salle Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Bogotá. 2009; 60-78. [acceso 30 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/14030/1/T41.09%20D85d.pdf>
- EPAOCSP 850.4100. Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guideline. Seedling Emergence and Seedling Growth. Washington DC. 2012a.
- EPAOCSP 850.4150. Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guideline. Vegetative Vigor. Washington DC. 2012b.
- EPAOPPTS 850.4200. Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guideline. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. Washington DC. 1996a.
- EPAOPPTS 885.4240. Environmental Protection Agency. Microbial Pesticide Test Guidelines. Fresh water aquatic in vertebrate testing Tier I. Washington DC. 1996b.
- EPAOPPTS 885.4280. Environmental Protection Agency. Estuarine and Marine Testing, Tier I. Fresh water aquatic invertebrate testing. Washington DC. 1996c.
- González Y, Aportela P. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. Anuario Toxicología. 2001; 1(1), 104-108.
- Hurtado L, Pérez B. Presencia de *Physa cubensis* (Pfeiffer, 1939) (Gastropoda: Physidae) en semilleros flotantes de Tabaco. Centro Agrícola. 2017; 44(3), 43-8.
- Iannacone J, Caballero C, Alvarino L. Empleo del caracol de agua dulce *Physa venustula* Gould como herramienta ecotoxicológica para la evaluación de riesgos ambientales de plaguicidas. Agric. Téc. 2002; 62(2), 212-225.
- Iannacone J, Alvarino L, Valle Riestra V, Ymaña B, Argota G, Fimia F, et al. Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). Rev. Toxicol. 2016; 33(1), 31-38.
- MINSAP. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental: Regulación 39/2004. Cuba: Buró Regulatorio; 2004.
- Nordberg G. Metales: Propiedades Químicas y Toxicidad. En: Mager J. Enciclopedia de salud y Seguridad en el trabajo. (2da ed.). Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones; 2012. p. 63.1-63.75.
- Ramírez P, Mendoza A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat); 2008. p.18-36.
- Rice E, Baird R, Eaton A. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23 ed. Washintong D.C. USA: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2017.p. 60-150.
- Serrano R. Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos. España: Universidad JAUME I; 2003.p.145-160.
- Silva J, Torrejón G, Bay-Schmith E, Larraín A. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un tóxico de referencia. Gayana (Concepción). 2003; 67(1), 87-96.
- Silva J, Fuentealba C, Bay-Schmith E, Larraín A. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. Gayana (Concepción). 2007; 71(2), 135-141.
- International Programme On Chemical Safety [INCHEM]. United Nation Environment Programme (UNEP), International Labour Organisation (ILO), World Health Organization (WHO) (1988) International Programme of Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria (EHC) CHROMIUM ICSC: 0029 Chrome October 2004. [acceso 5 de febrero del 2019]. Disponible

25. Vázquez A, Perera S. Endemic Freshwater molluscs of Cuba and their conservation status. *Tropical Conservation Science*. 2010; 3(2), 190-199.
26. Velasco J. Estandarización del bioensayo con *Artemia franciscana*, (Flössner, 1972) y el efecto ecotoxicológico del Sulfato de cobre (II) pentahidratado. [academia.edu]. Lima. Perú: Universidad Nacional Federico Villarreal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Escuela de Biología; 2016. [acceso 25 de junio de 2018]. Disponible en: http://www.academia.edu/7611718/Estandarizaci%C3%B3n_del_bioensayo_con_Artemia_franciscana_Fl%C3%B6ssner_1972_y_el_efecto_ecotoxicol%C3%B3gico_del_Sulfato_de_cobre_II_pentahidratado.
27. Zúñiga M, Vallejos P, Larrain A & Bay-schmith E. Toxicity of copper on four Chilean marine mussels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2003; 71, 1167-1174.