Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Toxicología

Evaluación de la lipoperoxidación inducida por exposición crónica a las fracciones solubles de diésel en agua sobre juveniles de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico)

TESIS

Para optar el Título Profesional de Toxicólogo

AUTOR

Ericka Pamela UNZUETA ARANDA

ASESORES

Dr. Mesías Moisés GARCÍA ORTIZ

Dra. Carmen Gladys PEÑA SUASNABAR (Coasesor)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Unzueta E. Evaluación de la lipoperoxidación inducida por exposición crónica a las fracciones solubles de diésel en agua sobre juveniles de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Toxicología; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Ericka Pamela Unzueta Aranda
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76801979
URL de ORCID	
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mesías Moisés García Ortiz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07200816
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7340-4757
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Carmen Gladys Peña Suasnabar
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	20904674
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5061-4527
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Jesús Víctor Lizano Gutiérrez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09148490
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Yadira Fernández Jerí
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	28307333
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09597625
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Rojas Ríos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09738868
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.3.1. Toxicología Ambiental
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: IMARPE País: Perú Departamento: Lima Provincia: Callao Distrito: Callao Latitud: -12.067328 Longitud: -77.157763 Edificio: Facultad Farmacia y Bioquímica-UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.055283 Longitud: -77.023522
Año o rango de años en que se realizó la investigación	octubre 2018- febrero 2019
URL de disciplinas OCDE	Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Evaluación de la lipoperoxidación inducida por exposición crónica a las fracciones solubles de diésel en agua sobre juveniles de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico)

Que presenta la Bachiller en Toxicología:

ERICKA PAMELA UNZUETA ARANDA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

19 (diecinueve) Aprobado con máximo Honores

de conformidad con el Art. 14.° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Toxicólogo (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 06 de julio de 2023.

Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez
Presidente

Dra. Yadira Fernández Jerí
Miembro

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Miembro

Mg. Luis Alberto Rojas Ríos
Miembro

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA PROFESIONAL DE TOXICOLOGÍA

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Gloria Clotilde Gordillo Rocha en mi condición de Directora de la Escuela Profesional de Toxicología acreditada con la R.R. N° 003759-2023-R-/UNMSM, que la Tesis, cuyo título es **Evaluación de la lipoperoxidación inducida por exposición crónica a las fracciones solubles de diéselen agua sobre juveniles de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico).** presentado por la Bachiller **Ericka Pamela Unzueta Aranda** para optar el Título Profesional de Toxicólogo (a).

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 6% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma de la Directora E.P. de Toxicología

DNI: 10223170

Nombres y apellidos de la Directora E.P. de Toxicología:
Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha

Fecha: 01-09-2023

AGRADECIMIENTOS

Al Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras (AFIMC) de la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura (DGIA) del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) por darme la oportunidad para realizar el presente trabajo en el laboratorio de Ecotoxicología Acuática.

A mis asesores; el Dr. Moisés García, por su asesoramiento, la buena predisposición y a la Dra. Carmen Peña, por todos los conocimientos brindados, su asesoramiento y por las instalaciones del laboratorio de bioquímica prestado.

A los profesionales del laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Aida Henostroza, Ricardo Dioses y Manuel Mendoza, que me apoyaron en la realización de la presente investigación, desde el tema logístico hasta anímico y un agradecimiento especial a Christian Paredes por la confianza y permitir que ingresara como tesista.

A mi familia por brindarme su apoyo incondicional.

Al Dr. Alfonso Apesteguia, director del Centro de Información y Control Toxicológico y apoyo a la Gestión Ambiental (CICOTOX), por permitir desarrollar a la par mi internado y pasantía en Imarpe. A mis amigos de CICOTOX, Dennis Contreras, Carlos Villaorduña, Lizbeth Pumayauli, Américo Figueroa, Javier Sánchez, Sheyla Susanibar, Víctor Espinoza, Santiago Moquillaza y Deysi Escobar por el apoyo y turnos cambiados.

A mis profesores de la Escuela Profesional de Toxicología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por sus enseñanzas y ser parte de mi formación profesional.

A los miembros del jurado por las sugerencias para la mejora de mi tesis.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	11
I.1.	Planteamiento del problema	13
I.2.	OBJETIVOS	13
I.2.1	OBJETIVO GENERAL	13
I.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
I.3.	Importancia y alcance de la investigación	14
I.4.	Limitaciones de la investigación	15
II.	REVISION DE LA LITERATURA	15
II.1.	Marco teórico	15
II.2.	Antecedentes del estudio	29
II.3.	BASES TEORICAS	33
II.4.	GLOSARIO DE TÉRMINOS(30,60)	36
III	HIPOTESIS Y VARIABLES	42
III.1.	HIPOTESIS	42
IV.2 VARIABLES		43
IV.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		43
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
V.2 AREA DE ESTUDIO		43
V.3 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN		44
V.4 POBLACION Y MUESTRA		44
V.5 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE INFORMACION		47
V.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO		54
VI.	RESULTADOS	54
IV.1.	PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS	54
V.	DISCUSIÓN	68
VI.	CONCLUSIONES	74
VII.	RECOMENDACIONES	75
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
IX.	ANEXOS	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables 43

Tabla 2. Rango de parámetros fisicoquímicos en bioensayos con *Argopecten purpuratus* 45

Tabla 3. Condiciones de prueba de toxicidad aguda (96h) con FSA diésel en *A. Purpuratus* 50

Tabla 4. Condiciones de bioensayo crónico con FSA diésel en *A. Purpuratus* (28 días). 52

Tabla 5. Concentraciones nominales de hidrocarburos totales de petróleo empleados en los bioensayos 55

Tabla 6. Bioensayo de control positivo a las 24 horas con $CdCl_2$ en Argopecten purpuratus 55

Tabla 7. Bioensayo de control positivo a las 48 horas con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus* 56

Tabla 8. Bioensayo de control positivo a las 72 horas con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus* 56

Tabla 9. Bioensayo de control positivo a las 96 horas con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus* 56

Tabla 10. Determinación de CL50 en bioensayo de control positivo con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus* 57

Tabla 11. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 24 horas en *Argopecten purpuratus* 58

Tabla 12. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 48 horas en *Argopecten purpuratus* 58

Tabla 13. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 72 horas en *Argopecten purpuratus* 58

Tabla 14. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 96 horas en *Argopecten purpuratus* 59

Tabla 15. Determinación de CL50 en bioensayo agudo con FSA de diésel en *Argopecten purpuratus* 59

Tabla 8. Pruebas de normalidad de Shapiro- Wilks y Prueba no Paramétrica Kruskal- Wallis en los días de muestreo en glándula digestiva 60

Tabla 9. Pruebas de normalidad de Shapiro- Wilks en los días de muestreo en branquias 61

Tabla 10. Pruebas de Homogeneidad de varianzas- branquias en el D7 y D14 61

Tabla 11. Prueba Tukey- branquias en el D7 62

Tabla 12. Prueba T3 Dunnet- branquias en D14 62

Tabla 13. Prueba Kruskal- Wallis- branquias en D21 y D28 63

Tabla 14. Valores de lipoperoxidación y proteínas en glándula digestiva de *A. purpuratus* expuestas al 0,4; 0,8 y 1,6% de FSA en los días 7, 14, 21 y 28. 64

Tabla 15. Valores de lipoperoxidación y proteínas en glándula digestiva de *A. purpuratus* expuestas al 0,4; 0,8 y 1,6% de FSA en los días 7, 14, 21 y 28. 66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de meteorización del hidrocarburo vertido en el entorno marino 16

Figura 2. Origen de contaminación por hidrocarburos en el mar. 22

Figura 3. Ciclo biológico de la *Argopecten purpuratus* "concha de abanico" 24

Figura 4. Bancos naturales de *A. purpuratus* en el litoral peruano. 25

Figura 5: Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie, 2019 26

Figura 6. Representación esquemática de la formación de MDA a partir de PUFA autooxidados y los factores que influyen en la formación de MDA derivado de lípidos(47) 29

Figura 7. Formación del aducto rojo fluorescente 1: 2 entre MDA y TBA a través de un mecanismo de adición nucleofílica catalizada por ácido(47). 35

Figura 8. Árbol de decisión para determinar el método a utilizar en el cálculo de CL50%, propuesto por la USEPA (2002)(58). 51

Figura 9. Diagrama de flujo de análisis estadístico de Bioensayo crónico 54

Figura 11. Valores de lipoperoxidación en glándula digestiva de *Argopecten purpuratus.* Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes. La comparación se realizó entre grupos expuestos durante el mismo tiempo. 65

Figura 12. Valores de lipoperoxidación en branquias de *Argopecten purpuratus.* Los grupos con la misma letra no son estadísticamente diferentes. Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes. La comparación se realizó entre grupos expuestos durante el mismo tiempo. 67

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Método 8015C de la EPA 85

Anexo 2. Aclimatación de los organismos en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática 86

Anexo 3. Preparación de soluciones de prueba 86

Anexo 4. Cuantificación de Hidrocarburos totales de petróleo (HTP) 87

La cantidad de hidrocarburos totales de petróleo en la muestra al 100% de fracción soluble de diésel en agua 1/4 w/v fue de 30,83 mg/L 87

Anexo 5. Vista frontal de las unidades de experimentación (filtración de alimento) 88

Anexo 6. Vista superior de las unidades de experimentación (cantidad de heces) 88

Anexo 7. Instalación de bioensayo crónico (aleatorización BCA) 89

Anexo 8. Parámetros fisicoquímicos de bioensayo crónico 90

ABREVIATURAS

CL50: Concentración letal media.

CE50 Concentración efectiva media

NOEL: Concentración de efecto no observado.

TM: Tonelada métrica.

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

LPO: Lipoperoxidación.

GST: Glutatión- S transferasa.

GPx: Glutatión peroxidasa.

MDA: Malondialdehído.

BSA: Solución de albúmina de suero bovino.

USEPA: Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos.

PRODUCE: Ministerio de Producción.

TSK: Trimmed Spearman- Karber.

IMARPE: Instituto del Mar del Perú.

AFIMC: Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras.

FONDEPES: Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero.

nmol: Nano moles

HTP: Hidrocarburos totales de petróleo.

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

BTEX: Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno.

FSA: Fracción soluble en agua

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados (siglas en ingles)

WSFG: fracción de gasolina soluble en agua (siglas en ingles)

UV: luz ultravioleta

1. **RESUMEN**

Diversas investigaciones han revelado los efectos agudos de la contaminación por hidrocarburos en los ecosistemas acuáticos; sin embargo, existe poca información de los efectos subletales causados por reducidas concentraciones por un periodo prolongado en los ecosistemas marinos. Por lo cual, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la lipoperoxidación inducida por la exposición crónica (28 días) a 0,4; 0,8 y 1,6% de las fracciones solubles de diésel en agua (FSA) sobre los juveniles de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico). La investigación fue experimental, prospectiva y longitudinal, desarrollándose en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática del Imarpe y Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Se realizó la cuantificación del contenido de hidrocarburos totales de petróleo mediante el método 8015-C de la EPA, además se determinó la concentración letal media (CL50) a 96 horas de exposición de FSA según el método PROBIT, finalizando con la evaluación de lipoperoxidación como biomarcador de efecto, en homogenizado de branquias y glándula digestiva a los 7, 14, 21 y 28 días de exposición a FSA determinando los valores de TBARS. Entre los resultados, el contenido de hidrocarburos totales de petróleo fue de 30,83 mg/L en el 100% de la solución madre. Se determinó una CL50 de 62,77% de FSA. Para bioensayo crónico, la concentración promedio de TBARS en glándula digestiva fue 92,01 ± 8,66; 134,57 ± 5,77; 156,71 ± 5,11 y 164,08 ± 3,45 nmol TBARS/mg prot, mientras que en las branquias presentó valores de 42,18 ± 2,41; 51,02 ± 2,76; 59,88 ± 2,36 y 74,33 ± 2,24 nmol TBARS/mg prot para los grupos control, 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA respectivamente, con diferencias significativas en relación al control. Se concluye que a partir de la concentración 0,4% de fracciones solubles de diésel en agua se evidenció una lipoperoxidación en los juveniles de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico), siendo el tejido con mayor respuesta la glándula digestiva.

Palabras claves: *Argopecten purpuratus*, bioensayos, fracciones solubles de diésel en agua, concentración letal media (CL50), biomarcadores, TBARS.

ABSTRACT

Various investigations have revealed the acute effects of hydrocarbon pollution on aquatic ecosystems; however, little information exists on sublethal effects caused by reduced concentrations for a prolonged period in marine ecosystems. Therefore, the objective of the present investigation was to evaluate the lipid peroxidation induced by chronic exposure (28 days) at 0,4; 0,8 and 1,6% of diesel water soluble fractions (FSA) on juveniles of *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico). The research was experimental, prospective and longitudinal, being developed in the Laboratory of Aquatic Ecotoxicology of the Imarpe and Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the UNMSM. The quantification of the content of Total Petroleum Hydrocarbons was carried out using the EPA 8015-C method, in addition, the Median Lethal Concentration (LC50) was extended to 96 hours of FSA exposure according to the PROBIT method, ending with the evaluation of lipoperoxidation as biomarker of damage, in homogenate of gills and digestive glands at 7, 14, 21 and 28 days of exposure to FSA measuring the levels of TBARS. Among the results, the content of total petroleum hydrocarbons was 30,83 mg/L in 100% of the mother solution. It will end with an LC50 of 62,77% FSA. For chronic bioassay, the average concentration of TBARS in digestive glands was 92,01 ± 8,66; 134,57 ± 5,77; 156,71 ± 5,11 and 164,08 ± 3,45 nmol TBARS/mg prot, while levels of 42,18 ± 2,41 were found in the gills; 51,02 ± 2,76; 59,88 ± 2,36 and 74,33 ± 2,24 nmol TBARS/mg prot for the control groups, 0,4; 0,8 and 1,6% FSA respectively, with significant differences in relation to the control. It is concluded that from the concentration of 0,4% of soluble fractions of diesel in water, a lipoperoxidation is evidenced in the juveniles of *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico), the preferred tissue being the digestive gland.

Keywords: Argopecten purpuratus, bioassays, soluble fractions of diesel in water, median lethal concentration (LC50), biomarkers, TBARS.

I. INTRODUCCIÓN

La composición química y biológica de las aguas marino- costeras son vulnerables a la introducción de sustancias no biodegradables y persistentes(1). El destino de los hidrocarburos derivados del petróleo en el entorno marino se ha investigado de manera amplia durante los últimos años(2,3). A pesar de que los derrames masivos de petróleo son la causa más notoria de contaminación por hidrocarburos en el entorno marino, las causas de menor impacto son las ocasionadas debido a las actividades de carga y descarga, relaves de refinería, residuos urbanos y deposición atmosférica(4).

En el año 1977, Truhaut R. define el término ecotoxicología como: "la disciplina científica que comprende el estudio de los aspectos tóxicos causados por los contaminantes, naturales o sintéticos, sobre los componentes de los ecosistemas, animales (incluyendo al hombre) vegetales y microorganismo, en un contexto integrado"(5). La ecotoxicología de los hidrocarburos derivados del petróleo son versátiles debido a que los efectos tóxicos dependen del tipo de compuesto, tiempo de exposición, estado, concentración del compuesto, condiciones ambientales y sensibilidad de los organismos afectados(6).

La mayoría de las investigaciones sobre contaminación acuática por hidrocarburos se han realizado con petróleo crudo, demostrando la variación de la toxicidad según el lugar de extracción debido a las diferentes concentraciones de compuestos individuales que conforman el petróleo crudo(7,8). Otros trabajos se han realizado con hidrocarburos puros de composición conocida(9–11), mientras que para hidrocarburos comerciales como el diésel, existe poca información sobre su toxicidad.

El impacto de los contaminantes en los bivalvos marinos se puede determinar mediante bioensayos como las pruebas de letalidad, efectos fisiológicos o empleando biomarcadores. Sabatini S. y Calcagno J.(12), en la revisión literaria "Los moluscos como bioindicadores" mencionan que: "los bivalvos son empleados en numerosos bioensayos debido a su amplia distribución geográfica, abundancia, rasgos sedentarios, alimentación por filtración,

longevidad, resistencia y capacidad de bioacumular xenobióticos de la columna de agua y de los sedimentos".(13–15)

Diversas investigaciones que han empleado bioensayos en organismos como: lapa marina, un molusco gasterópodo; mejillón, molusco bivalvo de la familia Mytilidae; o en peces como el salmonete y pez dorado "goldfish", pez de familia Mullidae y familia Cyprinidae respectivamente. Para medir el impacto de los hidrocarburos comerciales, se evalúan la variación de la actividad enzimática siendo la Glutatión peroxidasa la enzima que mostró un mayor efecto; mientras que la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas se vieron aumentadas significativamente después de 168 horas(16–18).

Otros estudios también han evaluado las respuestas genotóxicas en bivalvos como resultado de la exposición a la fracción soluble del diésel en agua(19). También se compararon las toxicidades de las fracciones solubles de petróleo crudo, diésel y gasolina en agua, mediante la determinación de concentración letal media (CL50), resultando 70,68%; 13,46% y 5,48%, respectivamente. Aunque las fracciones solubles de gasolina en agua resultaron ser más tóxicas que las de diésel, estos resultados corresponden a efectos agudos(20). Mientras que para evidenciar los efectos que causan los hidrocarburos en un escenario a largo plazo, se opta por mediciones de enzimas que componen el sistema antioxidante y el daño celular mediante peroxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos(18).

El presente estudio tiene como finalidad evaluar el efecto de la exposición a fracciones solubles de diésel en agua, mediante un biomarcador a través de la cuantificación de la lipoperoxidación producido por la exposición crónica de este toxico en un organismo bentónico, el cual es un molusco bivalvo filtrador de fácil manejo en laboratorio, *Argopecten purpuratus* conocido comúnmente como concha de abanico reuniendo las características para usarlo como bioindicador, al ser un organismo con rasgos sedentarios y sensible a perturbaciones, que en nuestro país está distribuido principalmente en las bahías de Sechura, Samanco y Paracas, representando uno de los mayores ingresos económicos en el sector pesquero.

I.1. Planteamiento del problema

La contaminación por hidrocarburos en los ecosistemas acuáticos es una de las fuentes de contaminación más importante en nuestro país. Se conocen sus efectos agudos, siendo letales ya sea por el contacto, ingesta e inhalación del hidrocarburo, sin embargo, existe poca información acerca de los efectos subletales que causan en pequeñas concentraciones por un tiempo prolongado en el ecosistema marino.

Se empleó al Argopecten purpuratus (Concha de abanico) en los bioensayos de toxicidad, para cuantificar lipoperoxidación, la cual fue expresada como nmol de TBARS/mg de proteína a fin de conocer los efectos subletales derivados por la contaminación de hidrocarburos comerciales como el diésel.

Formulación del problema:

Problema general

¿La exposición crónica a las fracciones solubles de diésel en agua en los juveniles de *Argopecten purpuratus* aumenta la lipoperoxidación?

I.2. OBJETIVOS

I.2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la lipoperoxidación inducida por la exposición crónica a fracciones solubles de diésel en agua sobre *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) juveniles.

I.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la concentración letal media (CL50) de cloruro de cadmio en *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) juveniles.
- ✓ Cuantificar el contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en la solución madre de los ensayos de toxicidad.
- ✓ Determinar la concentración letal media (CL50) de fracciones solubles de diésel para *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) juveniles.

- ✓ Cuantificar la concentración de TBARS en homogenizado de glándula digestiva y branquias de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) juveniles expuestos crónicamente a fracciones solubles de diésel en agua.
- ✓ Comparar la concentración de TBARS en homogenizado de glándula digestiva y branquias de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) juveniles expuestos crónicamente a fracciones solubles de diésel en agua.

I.3. Importancia y alcance de la investigación

La concha de abanico (Argopecten purpuratus) en el Perú crece en varios bancos naturales a lo largo del litoral. Estos bancos pueden verse afectados por contaminantes, entre ellos los hidrocarburos, producto de las actividades de extracción y transporte del mismo.

Es necesario profundizar sobre la toxicidad generada por los combustibles comerciales como el diésel, específicamente en las fracciones solubles de diésel en agua, ya que son las más biodisponibles para los seres vivos(21).

El uso de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) se justifica por ser un organismo de fácil manejo en laboratorio, rasgos sedentarios y sensible a perturbaciones, además, de ser de las especies de bivalvos de mayor importancia en el Perú debido a su gran demanda en el mercado nacional e internacional(12).

El empleo de biomarcadores (lipoperoxidación) en ecotoxicología sirve para evaluar la salud de las especies. Un biomarcador de efecto es una medida directa del daño tóxico a nivel molecular y celular. Estos efectos podrían comprometer la supervivencia a largo plazo de los organismos(14)

I.4. Limitaciones de la investigación

Se realizó una revisión exhaustiva en fuentes de información primarias, secundarias y terciarias, sin embargo, no existen investigaciones relacionadas a la lipoperoxidación inducida por fracciones solubles de diésel en agua mediante exposición crónica en el modelo animal de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico), al ser una especie que se desarrolla exclusivamente entre los territorios de Perú y Chile, no se ha desarrollado investigaciones concluyentes a su rol como bioindicador. Por lo tanto, el contraste de los parámetros bioquímicos evaluados en *Argopecten purpuratus* de la presente investigación, se realizaron mediante la comparación con los organismos *Mytella guyanensis*, *Laternula elliptica* y *Perna*, entre otros.

II. REVISION DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

HIDROCARBUROS

El término hidrocarburos, se usa para describir a un grupo extenso de varios cientos de sustancias químicas derivadas originalmente del petróleo crudo. En este sentido, los hidrocarburos de petróleo son realmente una mezcla compleja, denominados así porque casi todos los componentes están formados de carbono e hidrógeno(21).

HIDROCARBUROS EN EL ENTORNO MARINO

Los hidrocarburos se clasifican en distintos grupos dependiendo de su estructura química, sin embargo, las características más relevantes para su destino en el entorno marino son sus pesos moleculares y puntos de ebullición (generalmente similares), solubilidad en agua y biodisponibilidad (que están estrechamente vinculados). Así es como los compuestos con menor peso molecular tienden a tener los puntos de ebullición más bajos y son volátiles a bajas temperaturas ambientales. La mayor cantidad de estos compuestos pueden generar una toxicidad aguda, pero al llegar a la superficie del mar o la zona costera se evaporan tan rápidamente que su aportación a los impactos marinos es usualmente reducida(22).

Por otro lado, los hidrocarburos de alto peso molecular tienen un alto punto de ebullición, son resistentes a la degradación y son muy persistentes. Pueden ser también tóxicos por exposición crónica, pero generalmente son mucho menos biológicamente disponibles debido principalmente a su muy baja solubilidad en agua. Entre estos dos extremos existe una amplia gama de hidrocarburos, muchos de los cuales tienen el potencial de causar impactos biológicos negativos(22)

DESTINO DE LOS HIDROCARBUROS EN EL ENTORNO MARINO

Inmediatamente después que el hidrocarburo se vierte en el entorno marino se somete a una serie de procesos naturales, llamados “meteorización” ,como se ve la representación en la Figura 1, el cual actúa rápida y progresivamente, mediante el cual cambia sus características y lo distribuye mayormente desde sí mismo hacia otras direcciones del entorno. La relevancia de cada proceso sobre la distribución del hidrocarburo va a depender de las condiciones medioambientales donde se produce el derrame y de las propiedades fisicoquímicas del mismo(21).

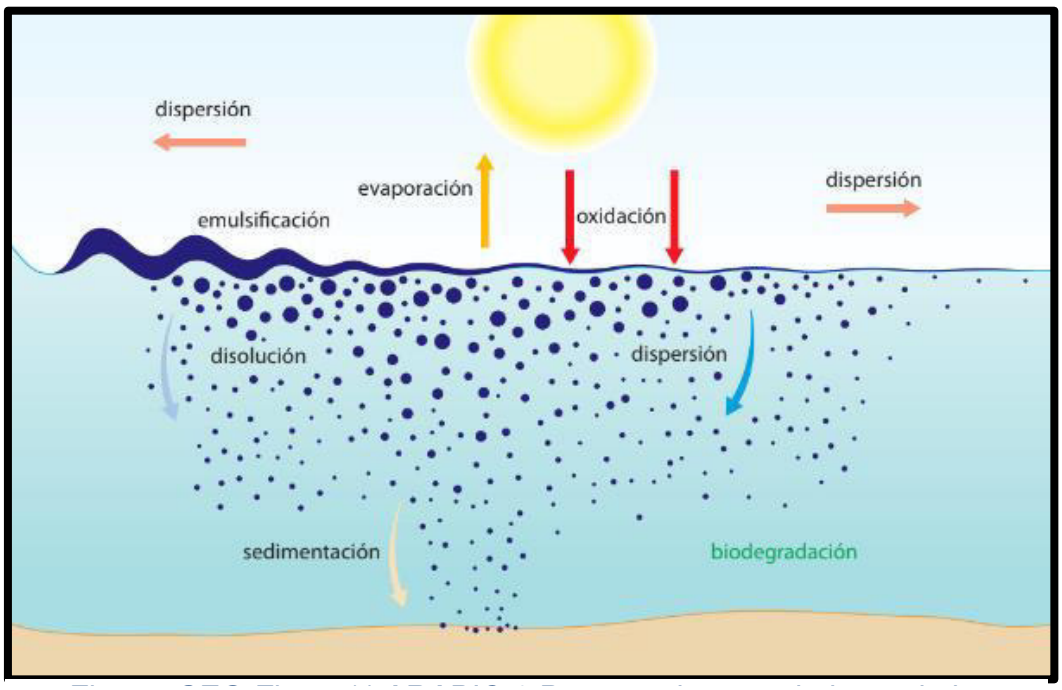


Figura 1. Proceso de meteorización del hidrocarburo vertido en el entorno marino

Evaporación

Gran parte de los hidrocarburos frescos lo conforman una fracción de bajo peso molecular y tienen bajo punto de ebullición. En el momento que son liberados en el entorno marino o costero, se evaporan dirigidos a la atmósfera empezará inmediatamente y estará mediada por la temperatura ambiental y la intensidad del viento. Este proceso eleva de manera progresiva la viscosidad del hidrocarburo vertido, y simultáneamente disminuye la cantidad y los efectos tóxicos agudos del hidrocarburo restante.(23)

Extensión y movimiento

En caso, el hidrocarburo sea vertido en la superficie marina, este se expandirá, a pesar que no haya movimiento de las mareas o vientos. La velocidad a la cual se extiende se ve influenciada por el "punto de escurrimiento" y viscosidad del mismo: los de bajo peso se expandirán muy velozmente, sin que sea relevante la temperatura del mar, en cambio los de elevado peso se expandirán gradualmente y se conservaran más viscosos por más tiempo, principalmente en mares de temperaturas frías, al mismo tiempo puede verse reducida la "tasa de dispersión". Quedarán expuestos las formas de vida superficial o animales que deban salir a la superficie para tomar oxígeno se verán afectadas por una porción de hidrocarburo, la dirección e intensidad de los vientos y las mareas influyen en el trayecto y dilatación de la expansión de la porción de hidrocarburo(24).

Cuanto más se expande y se distribuye el hidrocarburo, con mayor rapidez comenzará a seccionarse, lo cual resultará en muchas manchas de hidrocarburo.(9)

Disolución

En el momento que el hidrocarburo se vierte en el entorno marino, una mínima fracción se solubiliza; la cantidad y "velocidad de disolución" depende de su composición y viscosidad. Esta fracción soluble en agua

tiene un efecto desigual sobre los organismos marinos, al ser más biodisponible que otros hidrocarburos y, por lo tanto, mucho más tóxico. Las elevadas concentraciones de estos hidrocarburos usualmente se delimitan al agua inmediatamente cercana del hidrocarburo vertido y se genera una dilución rápida tanto ancha y profundamente(25).

Dispersión

El movimiento de las mareas, u otra perturbación del hidrocarburo por encima (o debajo) de la superficie del agua, conlleva en la generación de pequeñas gotas de hidrocarburo que se incorporan en la columna de agua; mientras más agitación, se mezclaran más rápidamente. La gran mayoría de los hidrocarburos vertidos, cualquiera fuese el origen del vertimiento (superficialmente, expulsado en el fondo del mar o encallado sobre la costa), se logra dispersar con el paso de los días. Las gotas más grandes incorporadas en la columna de agua retornar de manera rápida a la superficie, pero las gotas que son más pequeñas poseen menor flotabilidad y no llegan a retornar; se combinan a lo largo y profundo en la columna de agua. La expansión y hundimiento de la mezcla va a depender de la intensidad de las mareas y la dirección de las corrientes de agua. Este proceso puede exponer de manera potencial a la vida marina que se encuentre debajo de la superficie contaminada, siendo más vulnerables los organismos próximos a la zona impactada, por estar cercanos a una mancha de hidrocarburo en la superficie o a una columna que tiene su origen desde debajo de la superficie. Las gotas de hidrocarburo que se logran dispersar tienen una gran área de contacto lo que favorece la biodegradación de parte de los microorganismos(24).

Emulsificación

Partiendo del proceso anterior, cuando las partículas más grandes de hidrocarburo dispersado retornan a la superficie, en ese trayecto es posible que atrapen partículas de agua de mar dentro del área de la mancha de hidrocarburo que dará lugar a una “emulsión de agua en aceite”. Por consiguiente, paulatinamente el agua integrará la mayor parte de los

hidrocarburos mientras se mezclan en circunstancias de turbulencia (en mares moderadamente perturbados). Cuanta más agua integren a la emulsión, el volumen de la misma crecerá. Las emulsiones que se generen pueden ser estables o inestables, y tienen propiedades físicas distintas al hidrocarburo inicial. Las que son estables usualmente contienen elevada cantidad de agua (superando el 70%) y generalmente son altas en viscosidad. Estas denominadas “espuma de chocolate” pueden perdurar estables durante varios meses. La conformación de una “espuma estable” es posible que reduzca la “velocidad de dispersión”. Por otro lado, una espuma inestable puede descomponerse después de varios días, o tan solo durar un día, conservando el color negruzco del petróleo original(23,26).

Sedimentación

El rumbo y las consecuencias de los hidrocarburos dispersados se ven influenciados en su mayoría por el número de “sólidos en suspensión” (sedimentos finos y otras partículas) que se encuentran en la columna de agua. Las gotas dispersas de hidrocarburo podrían adherirse a sólidos en suspensión y de ese modo cambiaría sus características físicas. La sedimentación de estos sólidos en suspensión hacia las profundidades marinas es posible que ocurran, en tal caso podrían incorporarse a las porciones de fango o situarse como una agrupación suelta (floculas) de partículas que contengan en su interior hidrocarburos, o de las dos formas. El peor escenario sería cuando las concentraciones de hidrocarburos en los sedimentos en suspensión sean altas, haciendo que el peso mismo de las partículas contaminadas podría depositarse en el fondo, persistiendo durante muchos años y presentar efectos a largo plazo(1)

Hundimiento

El hundimiento en un panorama ecológico es un proceso en el cual no se forman “columnas” o “flóculos de partículas” que contengan hidrocarburos. El proceso de hundimiento sucede cuando el hidrocarburo vertido posee mayor densidad que el agua de mar, para finalmente llegar al fondo del mar y dependiendo del tipo de suelo puede llegar a enterrarse. La porción sobre

la cual se ha depositado el hidrocarburo es menor que la impactada por la sedimentación del hidrocarburo dispersado, pero el hidrocarburo hundido puede ocasionar una asfixia crónica y la pérdida del hábitat o desertificación. Aunque tales circunstancias no son usuales, el hidrocarburo vertido frecuentemente se traslada al litoral en las playas arenosas y se combina con la arena, lo que desencadena la formación de bolas y "láminas de alquitrán" que podrían asentarse en la parte de marea baja muy próximos a la playa. De igual manera, estas pueden perdurar y transformarse en un foco de contaminación crónica(1).

Encallamiento en la costa

Los procesos que se han descrito en la parte superior van a reducir de manera progresiva la cantidad vertida del hidrocarburo en una porción del hidrocarburo en la parte superficial, por consiguiente, es muy probable que en un escenario de vertimiento de hidrocarburos en el entorno marino produzca que ni una parte del hidrocarburo, o solamente mínimas porciones del mismo, se dirija a la zona costera. Aunque, la mayor parte de los derrames leves o grandes conducen a que mínimamente una porción del hidrocarburo llegue a la costa, lo cual afectaría a todo el abanico de hábitats y especies que se encuentren bajo el nivel de la marea alta, y, podría ser también sobre tal nivel.

Los procesos fisicoquímicos propios de la naturaleza van a continuar degradando el hidrocarburo y poco a poco lograran suprimirlo, sin embargo, el tiempo de eliminación cambia mucho y se encuentra influenciado por varios agentes. La duración será superior en sitios resguardados de la fuerza de las mareas(27).

Fotoxidación

La fotooxidación es un proceso que a través de la interacción con la luz visible se pretende la formación de radicales hidroxilos que dan lugar a una fase de oxidación en los componentes inorgánicos hasta simplificarlos a dióxido de carbono o iones y a la mineralización de los agentes contaminantes orgánicos.

Los hidrocarburos exhibidos a los rayos UV se oxidan químicamente con la luz y se transforman en distintos compuestos. La fotoxidación sucede frecuentemente en un compuesto derivado del proceso de envejecimiento, siendo preferentemente los hidrocarburos poli aromáticos más susceptibles. Los resultados de laboratorio de ciertos componentes, reportan que los subproductos derivados pueden presentar mayor toxicidad que los componentes originales, ya que son su solubilidad es mayor en agua. Esta mayor biodisponibilidad incrementa su eventual degradación. Los efectos tóxicos que provocan la fotooxidación sobre los hidrocarburos completos y sus fracciones siguen siendo materia de estudio(28).

Biodegradación

La naturaleza ha favorecido a través del tiempo la aparición de bacterias marinas, las cuales producen enzimas capaces de emplear los hidrocarburos del petróleo como fuente alimenticia. Estas aumentan en tamaño y número al metabolizar los hidrocarburos, y al mismo tiempo para convertirse en una fuente alimenticia para otras especies(29).

Mediante este proceso biológico la mayoría de hidrocarburos de un derrame se va a biodegradar como último proceso, y la energía y sus componentes retornarán a la cadena alimenticia. La biodegradación demanda una cantidad apropiada de oxígeno, nutrientes y compuestos traza, y su rapidez es de acuerdo la interacción de superficie de contacto con la cantidad del hidrocarburo; ósea, las gotas de hidrocarburos que se han dispersado se van a biodegradar más rápido a comparación de una porción de hidrocarburo viscoso o una porción de hidrocarburos en la orilla, las cuales se van a biodegradar más lentamente(30).

La Organización Oceana advierte que cada año los océanos son transitados como autopistas por las que atraviesan alrededor de 6,000 tanqueros trasladando un aproximado de 1500 millones de toneladas de petróleo crudo, de los cuales se producen un promedio de 25 accidentes anuales, como resultado son derramadas cantidades que ascienden a 700 toneladas de hidrocarburos de los cuales un 12% corresponden a accidentes de tanqueros petroleros y el 33% son vertidos deliberadamente

a partir de los Buques, principalmente debido al lavado ilegal de tanques en el mar, los cuales se ven representados en la Figura 2(31).

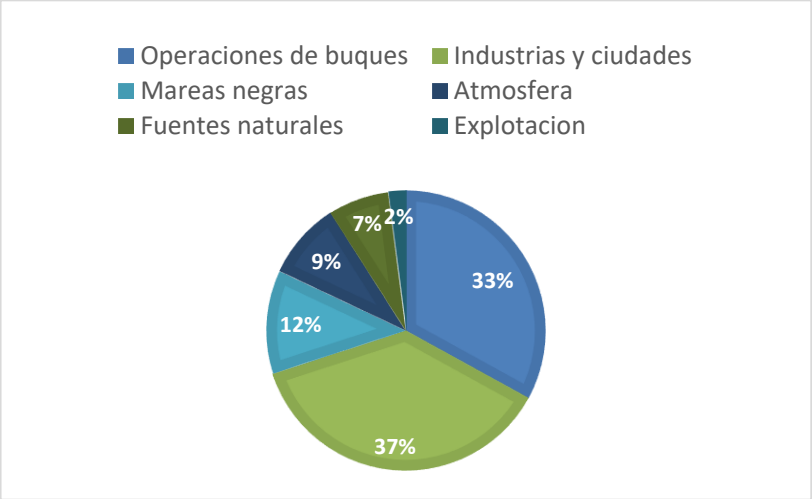


Figura 2. Origen de contaminación por hidrocarburos en el mar.

Diésel

El diésel, también llamado gasóleo o gasoil, es un hidrocarburo líquido obtenido a partir del petróleo, esencialmente de su destilación a temperaturas entre los 200ºC y 380ºC.

El gasóleo es más denso comparado con la gasolina y se evapora más lento por el número de carbonos que lo componen, posee mayor capacidad calorífica y presenta un mejor proceso de combustión. El diésel es 30% más eficiente que la gasolina, comparando la misma cantidad.

En consecuencia, es predominantemente empleado como combustible en embarcaciones pesqueras grandes y pequeños, también en embarcaciones recreativas, lo cual lo convierte en uno de los subproductos del petróleo más representativamente responsable del incremento de la proliferación de compuestos orgánicos tóxicos en el entorno marino(32). El Diésel es capaz de fomentar perturbaciones severas en los ecosistemas marinos, mediante sus fracciones solubles en agua (FSA) las cuales están biodisponibles para la biota marina(27). Esta disponibilidad biológica puede pasar mediante la sedimentación del hidrocarburo en el fondo marino y por su solubilidad en la columna de agua(33).

Argopecten purpuratus (CONCHA DE ABANICO)

Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Argopecten purpuratus* es la siguiente:

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Sub-clase: Pteriomorphia

Súper-orden: Euptheriomorphia

Orden: Pectinoida

Súper-familia: Pectinoidea

Familia: Pectinidae

Especie: *Argopecten purpuratus*(34)

Generalidades

La concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) es un organismo que se alimenta por medio de filtración de partículas suspendidas en la columna de agua, esencialmente de fitoplancton(35), posee un tipo de reproducción externa y es funcionalmente hermafrodita, logrando expulsar primero el esperma y luego los óvulos. Posee valvas grandes, sólidas, circulares, ligeramente convexas y de mayor longitud que altitud, con una mixtura de colores como blanco, rosado, café, púrpura(36). En la Figura 3, se aprecia el ciclo biológico de *Argopecten purpuratus.*



Figura 3. Ciclo biológico de la *Argopecten purpuratus* "concha de abanico"

Distribución geográfica

Se localizan en Perú y Chile, desde Paita (5.1 °S) hasta Valparaíso (33.1°S) (37). Este organismo se encuentra sobre todo en aguas profundas que oscilan entre los 5 a 40 metros en bahías semi- protegidas con suelo de tipo arenoso, rocoso y fangos y una supervivencia a temperatura entre los 12 y 25°C y salinidad entre 33 y 35 %(38).

La concha de abanico es un organismo de rápido desarrollo, alcanza una altura máxima de 160 mm(39). Su ciclo de vida se caracteriza por presentar dos etapas primordiales; la primera es en estado de larva pelágica la cual dura alrededor de 30 días partiendo de la fecundación (depende de la temperatura) y una bentónica la cual comienza en el momento que la postlarva se asienta en la profundidad y se fija a través de filamentos denominados biso. Aunque posee filamentos de biso que le permiten fijarse a un sustrato durante su estadío juvenil es capaz, aunque escaso, de locomoción(40).

Las reservas naturales con mayor presencia de concha de abanico según Mendo et.al.(38), son aquellas en las que se asientan mejor, de modo ininterrumpido u oscilante que dependen de las circunstancias del océano, son la "Bahía de Sechura", "Isla Lobos de Tierra", "Isla Blanca", "Bahía de

Samanco", "Los Chimus", "Las Salinas", "Guaynuma", "Tortugas", "Bahía Independencia", "Bahía de Paracas", "Lagunillas", "Isla San Lorenzo", "Isla El Fronton", entre otros, se muestra la distribución de los bancos naturales de *Argopecten purpuratus* en el litoral peruano en la Figura 4.

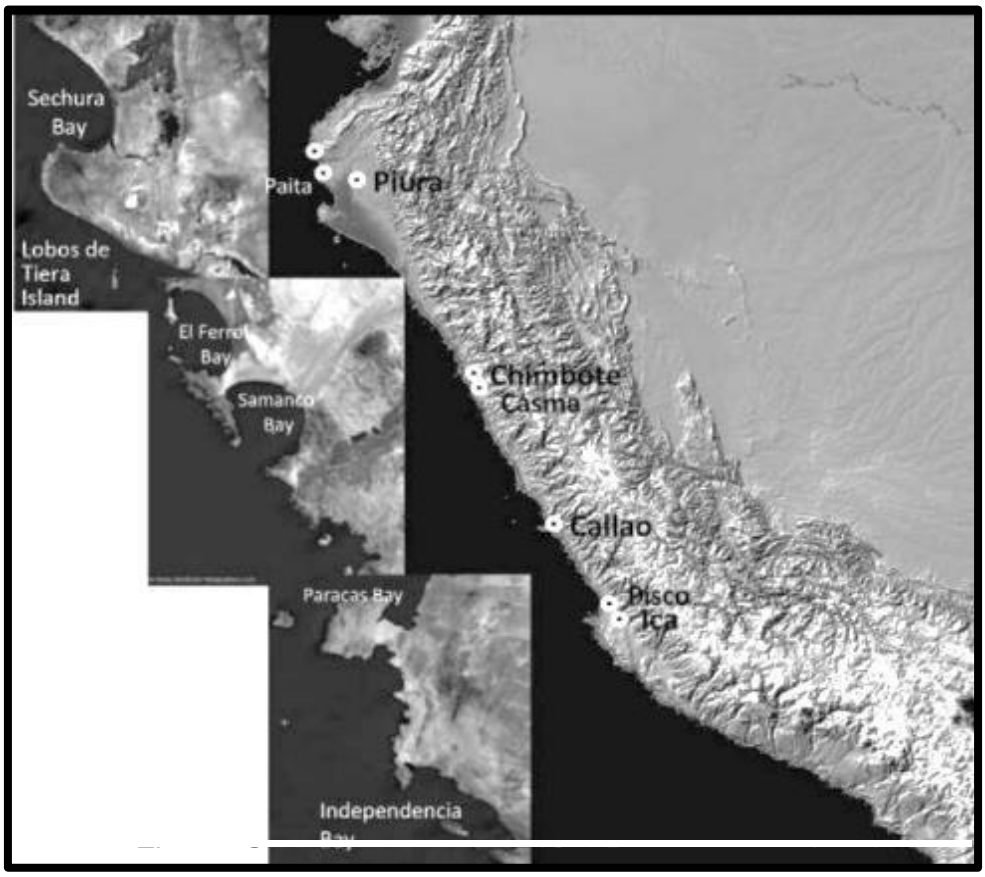


Figura 4. Bancos naturales de *A. purpuratus* en el litoral peruano.

Fuente: (Mendo et al., 2016)

Producción

En cuanto a la producción de "recursos hidrobiológicos" procedentes de la acuicultura, el Ministerio de Producción publicó en su último "ANUARIO ESTADÍSTICO PESQUERO Y ACUÍCOLA – 2019'' que el sector acuícola ha tenido una producción total de 104 330,18 TM, de las cuales 53 495,76 TM son pertenecientes a la cosecha total de "concha de abanico", representando el 33,2% de la producción total de la acuicultura (Figura 5). Del mismo modo, señala que la región de Ancash y Piura permanecen, en ese orden, a las áreas de producción más relevantes de concha de abanico(41)

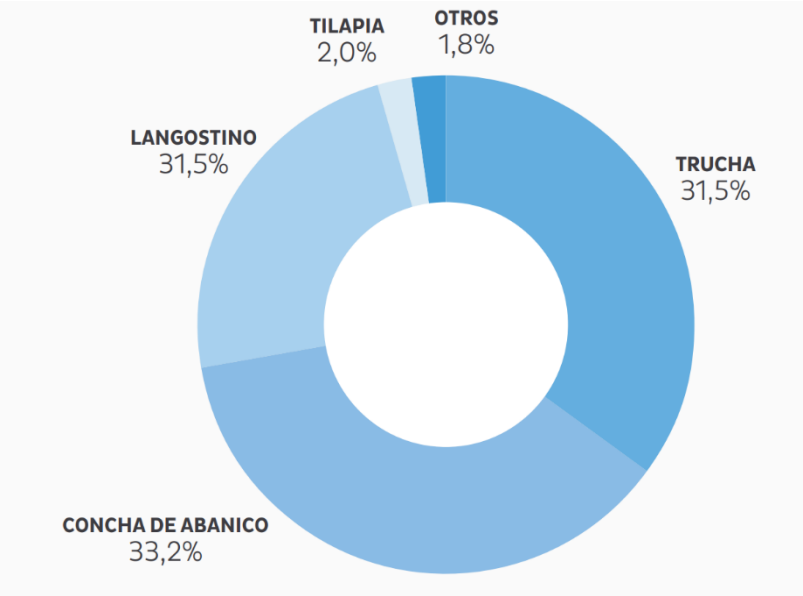


Figura 5: Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie, 2019

Fuente: “ANUARIO ESTADÍSTICO PESQUERO Y ACUÍCOLA – 2019’

Argopecten purpuratus como bioindicador

Particularmente los bivalvos son seleccionados como bioindicadores con el propósito de evidenciar alteraciones relacionadas con la presencia de contaminantes(12).

Los bioindicadores idóneos se caracterizan por:

- Amplia distribución geográfica y abundancia
- Rasgos sedentarios
- Resistencia y capacidad de bioacumular xenobióticos de la columna de agua y de los sedimentos
- Alimentación por filtración y longevidad(12)

BIOMARCADORES EMPLEADOS EN ECOTOXICOLOGÍA

Los biomarcadores son comúnmente descritos como una variable medible que expresan el resultado o las interacciones de agentes (tóxicos) con un objetivo molecular o fisiológico. Se sabe que generalmente las interacciones relevantes se llevan a cabo en un nivel bioquímico celular, siempre que esta modificación conforme el inicio de sucesos tóxicos en los organismos(42). Es decir, un biomarcador representaría un estado bioquímico que provocaría perjuicios en un nivel mayor de organización biológica.

Los biomarcadores contribuyen al entendimiento de los efectos tóxicos y son de gran utilidad en ecotoxicología(43).

Clasificación de biomarcadores

De acuerdo a la revisión, los tipos de biomarcadores se pueden clasificar en las siguientes categorías:

Marcadores de bioacumulación: Indicadores analíticos/químicos dentro de un organismo o sus productos (también denominados carga corporal)(42).

Biomarcadores de exposición: Marcadores que indican que se ha producido una respuesta bioquímica temprana después de la exposición de un individuo u organismo a un contaminante(42).

Biomarcador de efecto: Alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo medibles dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo que pueden reconocerse como asociados con una enfermedad o deterioro de la salud establecido o posible(42).

Biomarcador de susceptibilidad: Capacidad inherente o adquirida de un organismo para responder al desafío de la exposición a una sustancia xenobiótica específica, incluidos los factores genéticos y los cambios en los receptores que alteran la susceptibilidad de un organismo a esa exposición(42).

Estrés oxidativo y lipoperoxidación

En los seres vivos existe un equilibrio entre la generación de radicales libres y los sistemas antioxidantes pero existen perturbaciones que alteran dicho equilibrio, como un aumento en la proliferación de radicales libres que rebasa la capacidad de los antioxidantes, cuando esto sucede desencadena una serie de cambios moleculares tanto en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, estos cambios van a provocar modificaciones en la actividad enzimática, co-sustratos, alteración de expresión de genes y muerte celular, lo cual produce modificaciones a nivel funcional de los órganos(44).

Como se menciona, la alteración del equilibrio a favor de los agentes oxidantes frente al sistema antioxidante desencadena el llamado estrés oxidativo(45).

La lipoperoxidación es la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y lípidos que conforman las lipoproteínas y membrana celular

respectivamente, los cuales se convierten en radicales ácidos grasos, originando una cascada de reacciones oxidantes, representadas en la Figura 6. Como consecuencia de la lipoperoxidación se originan subproductos, siendo el conocidos como TBARS(46).

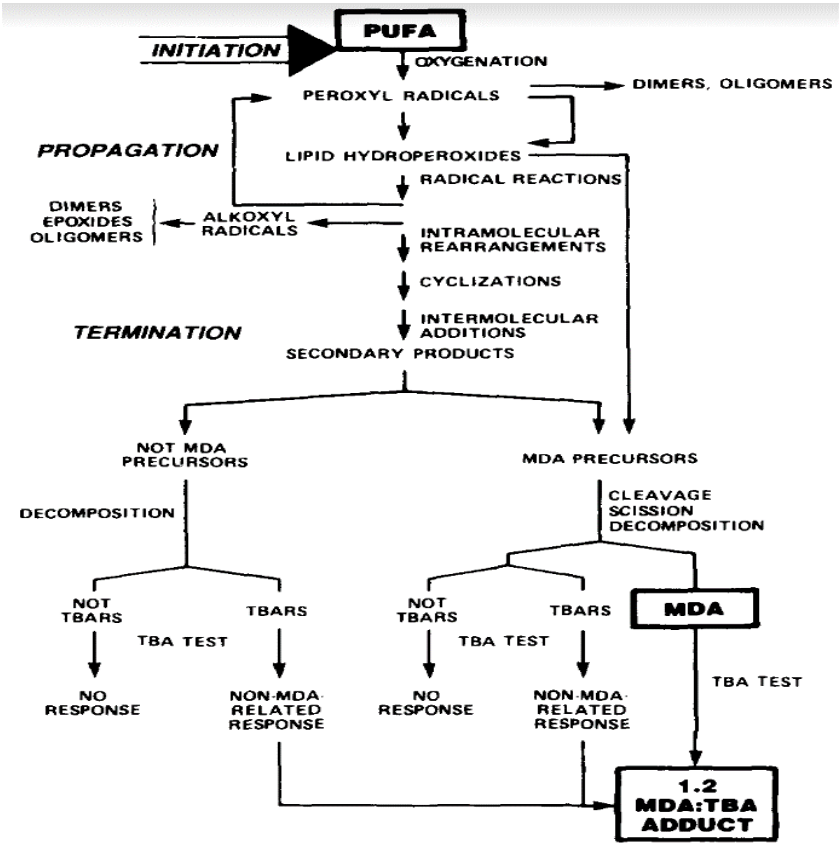


Figura 6. Representación esquemática de la formación de MDA a partir de PUFA autooxidados y los factores que influyen en la formación de MDA derivado de lípidos(47)

II.2. Antecedentes del estudio

Ansaldo y colaboradores en el año 2005, como parte de una expedición a la Antártida, evaluaron la actividad de las enzimas antioxidantes y el daño oxidativo en la glándula digestiva de la lapa *Nacella concinna* y la capacidad para ser consideradas como biomarcadores frente a la contaminación por hidrocarburos en las costas de la Antártida. Un total de 90 individuos fueron distribuidos en tres grupos con diferente cantidad de diésel mezclada con agua

de mar a concentraciones de 0%; 0,05% o 0;1% de diésel. Se estudió las actividades de las enzimas: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa, además de la lipoperoxidación y oxidación de proteínas de cada grupo expuesto a las 24, 48 y 168 horas. Los resultados mostraron que los niveles de actividad de la mayoría de las enzimas aumentaron de forma dependiente a la concentración de diésel. La enzima glutatión peroxidasa, aumentó su actividad notablemente en el grupo diésel al 0,1% con respecto al control. Mientras que la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas se vieron aumentadas significativamente en diésel después de 168 horas(16).

En el año 2016 Bettim y colaboradores ejecutaron una investigación con la finalidad de estimar los efectos tóxicos de la fracción de gasolina soluble en agua (WSFG) diluido al 1,5% en peces de agua dulce *Astyanax altiparanae,* con una exposición de 96 horas. Luego de la exposición aguda, se realizó una disminución de la contaminación (DC). Durante DC, el pez estuvo expuesto al WSFG durante 8 días, seguido de otros 7 días con renovación del 25% del volumen de las unidades de experimentación con agua limpia cada 24 horas. Se estimó la biotransformación hepática y renal, las defensas antioxidantes y los valores de lipoperoxidación (LPO). En el hígado, el WSFG 1,5% redujo el glutatión S-transferasa (GST) después de 96 horas y DC. En el riñón, solo en la depuración se observó un aumento de la actividad de GST, y después de DC un mayor valor de LPO. Se elevó la actividad de superóxido dismutasa (SOD) a las 96 horas en ambos tejidos; y solamente en el hígado también se evidenció durante la depuración. En WSFG a las 96 horas, la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en el riñón aumentó. De tal modo que este estudio aportó más datos sobre los efectos de WSFG en peces de agua dulce después de una exposición a concentraciones más bajas y un DC, aparentando una contaminación en el medio ambiente(19).

Braga y colaboradores en el año 2018, evaluaron las respuestas genotóxicas en el poliqueto *Laeonereis culveri* y el bivalvo *Anomalocardia flexuosa*, expuestos a la fracción soluble del diésel en agua. Después de la exposición, se monitoreó las respuestas de las enzimas de estrés oxidativo y se realizó el test de micronúcleos. La defensa antioxidante del glutatión S-transferasa y la

inducción de micronúcleos, se vieron significativamente afectados por los hidrocarburos aromáticos policíclicos, con una elevación importante en el séptimo día de exposición y en las concentraciones más altas, en comparación con los grupos de control. Ambas especies resultaron ser bioindicadores de respuestas tempranas y rápidas a contaminantes genotóxicos en hábitats estuarinos subtropicales. Dichos biomarcadores tempranos son muy útiles para desarrollar mejores protocolos para la evaluación y monitoreo del impacto en condiciones reales de campo(48).

Lister y colaboradores analizaron las actividades de las enzimas del sistema antioxidante, los niveles del glutatión, la carbonilación de proteínas y la lipoperoxidación como biomarcadores de estrés oxidativo en *Litthabitella elliptica* de lugares impactados por contaminantes en la Antártida en el año 2015. El objetivo fue evaluar la efectividad de estos biomarcadores para detectar el estrés en este invertebrado marino. Se cuantificó las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos totales, encontrándose elevado en las gónadas y los tejidos musculares de *L. elliptica* que habitan en lugares contaminados. Estos individuos exhibieron un mayor grado de impacto negativo que los del sitio de referencia, esto se evidenció por elevación en el daño oxidativo de lípidos y proteínas, así como una regulación positiva de las defensas del sistema antioxidante. En los sitios contaminados, la longitud de *L. elliptica* fue 1,3 veces menor que en los individuos del sitio de referencia. Los biomarcadores oxidativos demostraron ser indicadores provechosos de exposición a la contaminación en el presente estudio(49).

En el año 2004 Zhang y colaboradores, expusieron la larva de *Carassius auratus* (pez dorado) a 0,05 y 0,1 mg/L de diésel, durante 2; 4; 7; 10; 15; 25 y 40 días, y un grupo de control para cada grupo de exposición. Los peces sobrevivientes se trasladaron después de 25 días a agua diluida hasta el día 40. Se midieron y compararon los parámetros de defensa antioxidantes hepático, tales como glutatión y glutatión reducido, y las actividades de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. Todos los resultados indicaron que las respuestas antioxidantes de los peces a las dos concentraciones de exposición al diésel fueron similares en general.(18)

Vera y colaboradores en el año 2009, llevaron a cabo pruebas ecotoxicológicas para determinar los efectos agudos durante 96 horas del petróleo crudo, diésel y kerosene sobre el crecimiento en población de la microalga *Chaetoceros gracilis*. Las concentraciones de efectividad media (CE50%) a la cual se evidencia la inhibición del crecimiento de la mitad de la población, fueron de 90 mg/L , 98 mg/L y 867,5 mg/L para las soluciones heterogéneas de diésel kerosene y petróleo crudo respectivamente, concluyendo que la solución heterogénea diésel 2 resultó ser la más tóxica(50).

Alayo y Iannacone, desarrollaron un bioensayo con los rotíferos de "*Brachionus plicatilis rotundiformis* línea S" y "*Brachionus plicatilis hepatotomus* línea L", con la finalidad de evaluar un ambiente acuático con fracciones solubles en agua (FSA) con petróleo crudo, diésel 2, diésel 6. Determinaron la concentración letal media (CL50) a las 24 y 48 horas de exposición. Los efectos disminuyeron a 24 y 48 horas de exposición para ambas subespecies, en el siguiente orden creciente diésel 6, diésel 2 y petróleo crudo. No se encontró diferencias en la sensibilidad de ambas subespecies de "*Brachionus"*, por lo cual el autor de la investigación, propone un protocolo para este bioensayo empleando a "*B. plicatilis rotundiformis" y "B. plicatilis hepatotomus"* como una herramienta para evaluar el ambiente acuático. Esta especie mostró las siguientes ventajas: amplia distribución en el ambiente marino, confiabilidad, repetibilidad, corta duración del bioensayo y alta sensibilidad al compararse con otros dos microcrustáceos: nauplios de "*Artemia salina"* y "zoeas de *Emerita análoga"*(51).

En el año 2009, Montes evaluó el efecto ecotoxicológico en "larvas zoea I 2de "*Emerita análoga"*, empleando petróleo crudo. Los organismos fueron colectados de la "playa Cangrejos", departamento de Piura, Perú. Los organismos fueron expuestos a cinco tratamientos de petróleo crudo: 0,65 mg/L; 1,30 mg/L; 2,60 mg/L; 5,20 mg/L y 10,40 mg/L con tres réplicas. El bioensayo fue de tipo estático y se realizó por cuatro días. Se determinó la CL50 para las "zoeas I de *E. análoga"*, a 96 horas de exposición de petróleo crudo fue 1,33 mg/L. Los resultados representan que a la mayor concentración de tratamiento de petróleo crudo el organismo muestra mayor mortandad(52).

II.3. BASES TEORICAS

Bioensayos

Los bioensayos de toxicidad realizados sobre distintos organismos forman parte de diversos estudios ecotoxicológicos. Estos bioensayos se utilizan para detectar y evaluar la capacidad inherente de un agente tóxico de producir efectos adversos sobre los organismos vivos.

En resumen, un bioensayo se trata de exponer un:

- Conjunto de organismos seleccionados a

- Diferentes concentraciones de la sustancia destinada al bioensayo

- A una duración determinada

- Estimar luego el impacto ocasionado

El efecto de las sustancias químicas en los organismos va a depender de la concentración de la sustancia en el entorno a la cual el organismo está expuesto (exposición) y de la toxicidad de la sustancia.(53)

La toxicidad que se evaluará en el bioensayo es la consecuencia de la interacción entre la sustancia y el sistema del organismo; los seres vivos pueden por medio de reacciones metabólicas convertir al contaminante de tal manera que el resultado sea de menor tóxico o eliminarlo.

Bioensayos crónicos y agudos

Dependiendo del tiempo del bioensayo, los mismos pueden dividirse en:

- Agudo: destinados para determinar los efectos de los tóxicos en seres vivos durante un tiempo de corta duración de su ciclo de vida. Nos da una respuesta rápida de los organismos al efecto del tóxico. Usualmente el efecto es mortandad, o alguna otra respuesta, como, por ejemplo, inmovilidad o inhibición de crecimiento.

- Crónico: tiempo más extenso de presencia del tóxico (generalmente el bioensayo crónico deberá cubrir mínimamente 10% del período de vida del organismo), comúnmente se estiman efectos subletales (crecimiento, reproducción, comportamiento). Estos efectos son evidenciados en escenarios en los que la concentración del tóxico permite la supervivencia del organismo, pero se ven afectadas algunas de sus funciones biológicas(54).

En resumen, los efectos agudos de los agentes tóxicos sobre los seres del ecosistema acuático han sido analizados después de una exposición inapropiada de plaguicidas, eventos accidentales, y en ocasiones donde los efluentes sin su respectivo tratamiento son introducidos al cuerpo receptor (Ej.: mortalidad de peces).

Cuando estos efluentes, incluso previamente tratados, son introducidos continuamente en el ambiente acuático pueden ocasionar efectos crónicos debido a que los seres vivos están en contacto a bajas concentraciones de contaminantes por prolongados períodos de tiempo. Si estos contaminantes son degradables, duran poco tiempo en el entorno y a una cierta distancia del punto de descarga ya no se evidenciarán los efectos.

Si dentro de los contaminantes existen sustancias persistentes o bioacumulables, pueden ocasionar efectos sobre las poblaciones expuestas a largo plazo.(55)

Bioensayo de toxicidad aguda

Los bioensayos de toxicidad aguda es una herramienta muy útil para determinar los efectos adversos de una solución en los organismos prueba, generalmente, en un tiempo de exposición parcialmente corto, usualmente de 48 a 96 horas, la respuesta esperada es la mortandad, expresando el resultado en valores de concentración letal media (CL50) que es la concentración de la solución a la cual causa la mortalidad al 50% de organismos expuestos(56).

Ensayo de Peroxidación lipídica

El método utilizado se fundamenta en la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Cuando el MDA está en condiciones de bajo pH y alta temperatura, forma un aducto MDA-TBA (Figura 7), el cual es un complejo con color capaz de ser detectado por espectrometría a una longitud de onda de 535 nm(47). La formación y el efecto de radicales libres, originados por la acción de los contaminantes, se evalúa por medio de la técnica desarrollada por Buege y Aust (1978). Este análisis se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico para identificar la presencia de malondialdehído (MDA), que son el producto de la actividad de los radicales libres sobre las membranas.

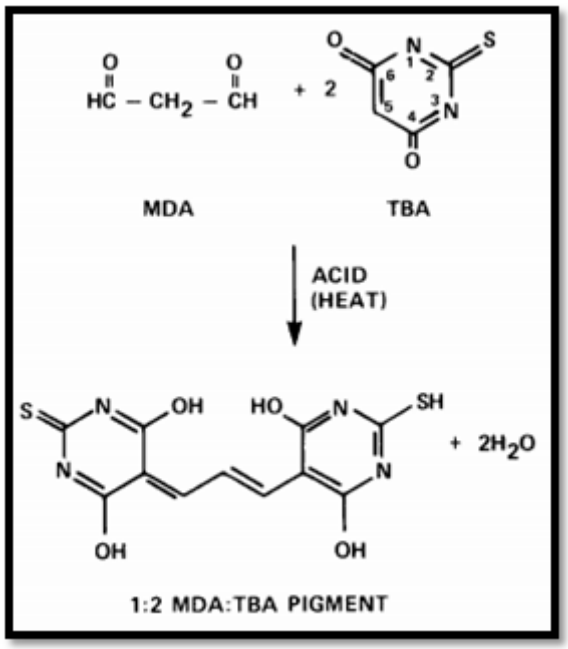


Figura 7. Formación del aducto rojo fluorescente 1: 2 entre MDA y TBA a través de un mecanismo de adición nucleofílica catalizada por ácido(47).

Determinación de Proteínas

El ensayo de proteínas de Bradford se emplea para medir la concentración de proteína total en una muestra. El fundamento de este análisis es la formación del complejo de partículas de proteína al colorante Coomassie en condiciones un medio ácido da como resultado una variación de color de

marrón a azul. Este ensayo determina la presencia de los residuos de “aminoácidos básicos, arginina, lisina e histidina”, que contribuyen a la creación del complejo proteína- colorante Coomassie. Procedimiento creado en el año 1976 por Bradford(57).

Parámetros fisicoquímicos

La verificación de la química del agua de mar es fundamental para el éxito del sistema de cultivo marino. La calidad del agua determinará si los procesos de soporte vital funcionan de forma razonable y constante. El agua de cultivo que se emplea en los bioensayos se controla de forma rutinaria para determinar la temperatura, la alcalinidad, el pH, el oxígeno disuelto (OD), salinidad. Se recomienda un control frecuente de estos parámetros durante los períodos de obtención del organismo y el inicio de nuevos sistemas de cultivo con filtros interiores subterráneos y filtración biológica fuera del tanque. El OD debe ser mantenido a más del 60% de saturación. El pH no debe bajar de 7,5 con un rango aceptable entre 7,5 y 8,3, los niveles bajos de pH pueden ser el resultado de hacinamiento, sobrealimentación o acumulación de desechos, especialmente en condiciones estáticas.(58)

Determinación de Hidrocarburos totales de petróleo

La denominación “hidrocarburos totales de petróleo” (TPH) es empleada para referirse a un grupo vasto de sustancias químicas que se derivan originalmente del petróleo crudo. Debido a la cantidad de hidrocarburos que lo conforman, usualmente no es apropiado cuantificar cada componente. Sin embargo, es útil medir la cantidad total del conjunto de hidrocarburos que se encuentran en una muestra de suelo, agua o aire. La medida de TPH que se cuantifica en una muestra se emplea como indicador habitual del tipo de contaminación que existe en el sitio(59)

II.4. GLOSARIO DE TÉRMINOS(30,60)

Aromáticos: Clase de hidrocarburos que comprenden una o más estructuras de anillo de benceno que tienen dobles enlaces alternos; puede

tener una o más cadenas laterales de alquilo en varias posiciones, pero no heteroátomos.

Bentónico: Relativo al bentos.

Bentos: Comunidad formada por los organismos que habitan el fondo de los ecosistemas acuáticos.

Bioacumulación (o bioconcentración): Tendencia de las sustancias a acumularse en el cuerpo de los organismos; la absorción neta de la dieta, la respiración o la transferencia a través de la piel y la pérdida debida a la excreción o el metabolismo. El factor de bioacumulación (BAF) o factor de bioconcentración (BCF) es la relación entre las concentraciones en el tejido y las concentraciones en una fuente, es decir, agua o dieta.

Biodisponibilidad (o disponibilidad biológica): Compuesto que se encuentra en forma física o química que puede ser asimilado por un organismo vivo; también, la proporción de una sustancia química en un compartimento ambiental (por ejemplo, agua) que puede ser absorbida por un organismo.

Biodegradación: Proceso natural de transformación microbiana de sustancias químicas, como el aceite, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas; la biodegradación del aceite generalmente requiere nutrientes, como nitrógeno y fósforo; la transformación puede ser completa, produciendo agua, dióxido de carbono y/o metano, o incompleta, produciendo sustancias químicas parcialmente oxidadas.

Bioestimulación: También conocido como enriquecimiento de nutrientes, el método de adición de nutrientes como fósforo y nitrógeno a un ambiente contaminado para estimular el crecimiento de los microorganismos susceptibles de biodegradación.

Biomagnificación: Fenómeno de la cadena alimentaria o de la red alimentaria por el cual una sustancia o elemento aumenta en concentración a niveles tróficos sucesivos; ocurre cuando una sustancia es persistente y se

acumula en la dieta más rápido de lo que se pierde debido a la excreción o al metabolismo.

Biomarcadores: Término que se utiliza en ecotoxicología, un biomarcador es un proceso bioquímico, producto, alteraciones bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas o en el comportamiento causadas por exposición a compuestos tóxicos que pueden ser medidos en un sistema o en una muestra biológica, el cual nos indica la exposición del organismo a un contaminante y / o los efectos tóxicos del contaminante.

Biorremediación: Estrategia de intervención para mejorar la biodegradación de los hidrocarburos derramados (u otros contaminantes), que van desde ninguna acción correctiva más que el monitoreo (atenuación natural) hasta la adición de nutrientes (bioestimulación) y la inoculación con comunidades microbianas competentes (bioaumentación).

Bivalvo: Pertenecientes al filo Mollusca, son organismos que están comprimidos por los laterales y las partes blandas del cuerpo son cubiertas por la concha, las cuales las conforman dos valvas unidas por una charnela. Las “branquias o ctenidios” de los animales de esta clase son órganos con doble función tanto para la alimentarse, así como para respirar.

CE50: La concentración efectiva media (CE50) es la concentración a la cual el 50% de los organismos presentan algún efecto ante la exposición de un compuesto.

CL50: La concentración letal media (CL50) es la concentración de una sustancia medida a la cual el 50% de los organismos mueren en un periodo de exposición determinado.

Columna de agua: Cilindro imaginario de agua de la superficie al fondo de un cuerpo de agua; las condiciones del agua, la temperatura y la densidad varían a lo largo de la columna de agua.

Compuestos orgánicos volátiles (COV): Sustancias químicas que tienen alta presión de vapor a temperatura ambiente (y el correspondiente punto de

ebullición bajo) que, por lo tanto, tienden a evaporarse o sublimarse en el aire; por ejemplo, BTEX.

Destino: Resultado; el destino de un derrame de petróleo es lo que le sucede al hidrocarburo.

Dispersión: Suspensión de gotitas de aceite en agua mediante la acción natural del viento y las olas, producción de materiales biológicos (biosurfactantes) y / o formulaciones de dispersantes químicos.

Dispersante: Químico o mezcla de químicos que se aplica, por ejemplo, a un derrame de petróleo para dispersar la fase oleosa en pequeñas gotas en la fase acuosa.

Efectos subletales: Lesiones que afectan la salud y condición física de los organismos (incluidos huevos y larvas) pero no dan lugar a la muerte de juveniles o adultos organismos.

Evaluación de riesgos ecológicos: Proceso de análisis y evaluación de la posibilidad de efectos ecológicos adversos provocados por contaminantes ambientales.

Emulsificación: Formación de gotas de agua en una matriz de aceite (agua en aceite) o, a la inversa, de gotas de aceite en una matriz de agua (aceite en agua) que se logra mediante la acción de la agitación, como la actividad del viento y las olas; puede ser inestable, separándose en fases oleosa y acuosa nuevamente poco después de la formación, o estable durante meses o años.

Especies reactivas de oxígeno (ROS): Grupo de sustancias químicas que pueden causar daño celular debido a su alta reactividad; se liberan durante las reacciones que agregan oxígeno a los dobles enlaces. A su vez, las ROS pueden reaccionar con dobles enlaces en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos para cambiar su estructura y función.

Evaluación de impacto ambiental: El proceso de medir o estimar los efectos ambientales de contaminantes, como derrames de petróleo, en relación con las condiciones en un sitio de referencia o en un momento anterior a un derrame.

Fracción de aceite acomodada en agua (WAF): Hidrocarburos que se repartirán de aceite a agua durante una agitación o mezcla suave; puede contener gotitas, a diferencia de las fracciones solubles en agua (WSF).

Fracción de aceite soluble en agua (WSF): Solución acuosa de hidrocarburos que se separa del aceite; no incluye gotas ni partículas de aceite.

Hidrocarburo: Sustancia química que se compone únicamente de carbono e hidrógeno; Los productos químicos que contienen heteroátomos, como nitrógeno, azufre y / u oxígeno, no son hidrocarburos, aunque pueden ser componentes del petróleo.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Subclase de hidrocarburos aromáticos que tienen dos o más anillos de benceno condensados; también puede tener una o más cadenas laterales de alquilo, generando grandes conjuntos de isómeros; algunos se consideran "contaminantes prioritarios" debido a su toxicidad y / o carcinogenicidad potencial.

Hidrocarburos totales de petróleo (TPH): Masa total de todos los hidrocarburos en una muestra de aceite o ambiental, incluidos los hidrocarburos volátiles y extraíbles (no volátiles).

Kow: Coeficiente de partición que describe la relación de concentración de equilibrio de una sustancia química disuelta en octanol frente a en agua, en un sistema de dos fases a una temperatura específica; utilizado en la predicción de toxicidad.

Mecanismo de acción (MOA): Describe un cambio funcional o anatómico a nivel molecular.

Meteorización: Conjunto de cambios en la composición y propiedades del aceite derramado provocados por una variedad de procesos ambientales que incluyen propagación, evaporación, fotooxidación, disolución, emulsificación y biodegradación, entre otros.

Mineralización: Oxidación completa de un compuesto (por ejemplo, hidrocarburo) a dióxido de carbono y agua; puede ser logrado por una sola especie de organismo o por una comunidad de microbios.

Modo de acción (MoA): Describe un cambio funcional o anatómico a nivel celular, resultante de la exposición de un organismo vivo a una sustancia.

Mortalidad: La proporción de muertes en la población o en un número específico de la población.

Oleófilo: Tiene una fuerte afinidad por los aceites; oleofílico los materiales absorben o se adhieren a los aceites.

Oxidación: Reacción química que ocurre cuando una sustancia se combina con oxígeno; la oxidación puede conducir a degradación o deterioro de la sustancia.

Partición: Difusión de compuestos entre dos fases líquidas inmiscibles, incluidas las gotas de agua y aceite y las membranas de agua y lípidos.

Petróleo: Sinónimo de crudo; una mezcla compleja de origen natural de miles de diferentes moléculas de hidrocarburos y no hidrocarburos.

Petróleo crudo: Sinónimo de petróleo; una mezcla compleja de origen natural y típicamente líquido de miles de diferentes moléculas de hidrocarburos y no hidrocarburos.

Petróleo crudo convencional: Comúnmente definido como petróleo líquido que fluye en el reservorio y en las tuberías y se recupera de los pozos de petróleo tradicionales utilizando métodos establecidos, incluida la recuperación primaria y la inundación de agua (por ejemplo, condensados, crudos ligeros y medianos), versus crudos no convencionales.

Ratio aguda-crónica: Razón de los valores de toxicidad aguda y crónica para un compuesto dado, generalmente el promedio de las razones para una variedad de especies; se utiliza para estimar la toxicidad crónica de un compuesto o una mezcla de compuestos, a partir de la toxicidad aguda medida o modelada cuando no se dispone de datos de toxicidad crónica

Sésil: Organismo acuático que crece adherido o sujeto al sustrato, del cual no se separa ni se desplaza.

Surfactante: Sustancia que descompone el aceite en pequeñas gotas; esto ayuda a aumentar la superficie del derrame de petróleo, que aumenta la velocidad a la que el aceite puede degradarse o degradado en sustancias menos tóxicas.

Tensión superficial: Fuerza de atracción ejercida sobre las moléculas superficiales de un líquido por las moléculas debajo de la superficie. Cuando se derrama aceite sobre el agua, esta tensión hace que el aceite se comporte como una lámina delgada continua que es difícil de separar o separarse.

Unidad tóxica (UT): Relación entre la concentración de un compuesto en el agua y un criterio de valoración tóxico (p. Ej., CL50 de 96 horas).

III HIPOTESIS Y VARIABLES

III.1. HIPOTESIS

Hipótesis Nula (H0)

La exposición crónica a las fracciones solubles de diésel en agua en los juveniles de *Argopecten purpuratus* no aumenta significativamente la lipoperoxidación

Hipótesis Alterna (H1)

La exposición crónica a las fracciones solubles de diésel en agua en los juveniles de *Argopecten purpuratus* aumenta significativamente la lipoperoxidación

IV.2 VARIABLES

Variable dependiente: Lipoperoxidación (nmoles TBARS/ mg proteína).

Variable independiente: Fracciones solubles de diésel en agua

IV.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 1. Operacionalización de variables

Variable	Tipo de variable	Dimensiones o Categorización	Definición	Indicador	Nivel de medición	Unidad de medida	Índice
Lipoperoxidación	Dependiente	Variable numérica: Cuantitativa	Daño oxidativo a los lípidos mediado por especies oxidantes reactivas.	Absorbancia	Razón	nmoles de TBARS/ mg de proteína	Número
Fracciones solubles de diésel en agua	Independiente	Variable numérica: Cuantitativa	Solución de hidrocarburos de baja masa molecular que se liberan de forma natural del diésel cuando se mezcla con agua.	Hidrocarburos totales de petróleo (HTP´s)	Razón	mg/ L	Número

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.2 AREA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática del Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras (AFIMC), del Instituto del

Mar del Perú (IMARPE) durante los meses de octubre del 2018 a marzo del 2019, ubicación 12°04′01″S 77°09′28″O. La interpretación de los resultados se realizó en la Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayo de San Marcos, ubicación 12°03′28″S 77°01′23″O.

V.3 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue experimental, prospectiva, longitudinal durante el desarrollo del bioensayo.

V.4 POBLACION Y MUESTRA

La cantidad de organismos de *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) estuvo conformada por un total de 384 organismos, las cuales fueron sometidos a la prueba aguda y crónica.

Bioensayo agudo: Se utilizaron 240 organismos, distribuidos en un total de 6 grupos (5 grupos experimentales a concentraciones de fracciones solubles de diésel en agua al 6,25; 12,5; 25; 50 y 100% w/v (diésel/agua de mar filtrada) y 1 grupo como control negativo), cada grupo contenía 10 individuos, además el ensayo se realizó en 4 réplicas, con un tiempo estimado de 96 horas equivalentes a 4 días.

Bioensayo crónico: Se utilizaron 144 organismos, distribuidos en 4 grupos, (3 grupos experimentales a las concentraciones de fracciones solubles de diésel en agua al 0,4; 0,8 y 1,6 % w/v (diésel/agua de mar filtrada) concentraciones de tóxico y 1 grupo control negativo), cada grupo contenía 12 individuos, además el ensayo se realizó en 3 réplicas, con un tiempo estimado de 28 días.

Cumpliendo los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

a) Criterios de inclusión:
    - *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) en el estadio juvenil a 30 ± 2 mm de altura.

- *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico) que reaccionen ante la punción en el manto

b) Criterios de exclusión
   - Agua del mar (control negativo) con parámetros fisicoquímicos extremos(61):

Tabla 2. Rango de parámetros fisicoquímicos en bioensayos con *Argopecten purpuratus*

Parámetro	**No permitido**	**No permitido**
Temperatura (°C)	menor a 13	mayor a 20
Potencial de hidrogeno (pH)	menor a 6	mayor a 9
Oxígeno disuelto (mg/L)	menor a 2	mayor a 14
Salinidad (%)	Menor a 34	mayor a 37

EQUIPOS Y MATERIALES

Reactivos

- Ácido tiobarbitúrico (marca Merck)
- Ácido tricloroacético (marca Merck)
- Ácido clorhídrico (marca Merck)
- Buffer fosfato salino (PBS) (marca Sigma Aldrich)
- Reactivo Bradford
- Solución de albúmina sérica bovina al 20%

Equipos

- Mesa termorregulable
- Agitador magnético (marca Thermos Scientific)
- Cabina de extracción (marca C4)
- Cocinilla eléctrica
- Medidor multiparámetros (marca Hach HQ40d)
- Balanza electrónica (marca Mettler Toledo)

- Balanza analítica (marca Ohaus)
- Espectrómetro UV-VIS (marca Perkin Elmer)
- Estufa (marca Memmert)
- Centrifuga (marca Hettich)
- Lector de microplaca UV- VIS (marca)
- Cromatógrafo de gases con detector FID (marca Agilent)

Materiales

- Vasos de precipitado de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Micropipetas de 20, 100, 1000 µL.
- Tubos de ensayo
- Viales
- Baldes de 4 L (unidad de investigación)
- manguerillas de aireación

V.5 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE INFORMACION

Obtención de organismos y aclimatación

Los juveniles de *Argopecten purpuratus* fueron obtenidos de centros de cultivo del Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES) de Casma y aclimatados en el Laboratorio Húmedo de Ecotoxicología Acuática del Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras (AFIMC), del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en tanques de fibra de vidrio de 200 L de capacidad, con agua de mar filtrada y esterilizada con UV (Anexo 2). Se realizó recambio total de agua diariamente y su alimentación estaba basada en dos tipos de microalgas: *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis* con una densidad aproximada de 6 millones de cél/mL, administrándoles en total 40 L diarios de microalgas.

Preparación de soluciones de prueba

El diésel se obtuvo de una gasolinera comercial (densidad 0,87 g/cm^3). Las fracciones solubles de diésel en agua se prepararon en cabina extractora, sin luz, mezclando una parte de combustible con cuatro partes de agua de mar filtrada (1:4 w/v), empleando un agitador magnético a 500 rpm, durante aproximadamente 22 horas. Transcurridas las 22 horas se mantuvieron 1 hora en reposo y se retira el diésel del agua de mar en un embudo de separación de 1 L de capacidad (Anexo 3) la solución obtenida fue el 100% de fracción soluble de diésel en agua, a partir de la cual se prepararon las diluciones para las concentraciones en los bioensayos(62).

Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo

Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP's) se cuantificaron en el 100% de la solución de fracción soluble de diésel en agua de mar equivalente (1:4 w/v diésel: agua de mar filtrada), mediante el método 8510-C de la EPA (Anexo 1) para Compuestos orgánicos no halogenados por Cromatografía de gases, usando un cromatógrafo de gases con detector FID(63).

Condiciones

- Caudal de gas portador (helio): 5-7 ml / min
- Caudal de gas auxiliar (helio): 30 ml / min
- Temperatura del inyector: 200 °C
- Temperatura del detector: 340 °C
- Programa de temperatura:
- Temperatura inicial: 45 °C, mantener durante 3 min
- Programa: 45 °C a 275 °C, a 12 EC / min
- Temperatura final: 275 °C, mantener durante 12 min.

Bioensayos de toxico de referencia(58)

Previamente a la realización de bioensayos de toxicidad aguda y crónica, es fundamental llevar a cabo un bioensayo de toxicidad aguda con sustancias controles positivos (tóxicos de referencias).

La USEPA, recomienda ciertos tóxicos de referencia como:

- "Cloruro de sodio (NaCl)"
- "Cloruro de potasio (KCl)"
- "Cloruro de cadmio ($CdCl_2$)"
- "Sulfato de cobre ($CuSO_4$)"
- "Dodecilsulfato de sodio (SDS)"
- "Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)"

Estos compuestos se emplean con la finalidad de determinar la sensibilidad de los organismos utilizados en los bioensayos de toxicidad. Además, se emplean con la finalidad de asegurar el efecto en los organismos expuestos a causa de determinado agente tóxico y que no sea debido a perturbaciones de la salud de los organismos y tampoco a errores en el proceso que se lleven a cabo durante los bioensayos ecotoxicológicos.

Para el presente trabajo se realizó un bioensayo agudo con juveniles de *Argopecten purpuratus*, para determinar CL50 a las 96 horas, empleando Cloruro de cadmio como tóxico de referencia en las siguientes concentraciones: 4; 2; 1; 0,5 y 0,25 mg/L. Se registró diariamente la mortandad y se retiraron las que cumplan con el criterio de mortandad (carencia de movimiento ante una punción en el manto). Se registraron los parámetros fisicoquímicos en el día de la instalación y en la finalización del

bioensayo. Se consideró un diseño experimental de bloque totalmente aleatorio (DBCA) de 6 x 4 (1 tratamiento control, 5 tratamientos experimentales x 4 réplicas por tratamiento).

Bioensayo de toxicidad aguda(58)

Con la finalidad de definir las concentraciones de los tratamientos en el bioensayo crónico, primero se realizó un bioensayo de corta duración 4 días (96 horas) donde los organismos fueron sometidos a una prueba de toxicidad aguda durante 96 horas en las que estuvieron expuestos a diferentes concentraciones de fracciones solubles de diésel en agua, sin alimento. Se registró diariamente la mortandad y se retiraron las que cumplan con el criterio de mortandad (carencia de movimiento ante una punción en el manto). Se registraron los parámetros fisicoquímicos en el día de la instalación y en la finalización del bioensayo. Se considero un diseño experimental de bloque completamente aleatorizado (DBCA) de 6 x 4 (1 tratamiento control, 5 tratamientos experimentales x 4 réplicas por tratamiento)

Tabla 3. Condiciones de prueba de toxicidad aguda (96h) con FSA diésel en *A. Purpuratus*

Tipo de bioensayo	**Estático**
Temperatura	20 ± 2°C
Intensidad luminosa	600-1000 lux en la superficie del líquido
Fotoperíodo	12 horas luz: 12 horas oscuridad
Volumen del recipiente	1 L
Volumen de la solución de prueba	1 L
Organismos	Juveniles de *Argopecten purpuratus* 30 ± 2 mm de longitud
Densidad de organismos	10 organismos/L
Concentraciones	100; 50; 25; 12,5; 6,25% de Fracciones solubles de diésel en agua.
Número de réplicas	Cuatro
Control negativo	Agua de mar filtrada
Duración de la prueba	96 h
Efecto medido	Letalidad (CL50). Caracterizado por la ausencia de movimiento de cilios que se localizan en la parte exterior del manto.
Aceptabilidad de los resultados	La mortalidad en el control negativo no debe exceder el 10%

Concentración letal media (CL50)(58)

Para el cálculo de la CL50, se utilizó el diagrama de decisión y software suministrado por la US Environmental Protection Agency (USEPA) 2005: Probit Analysis Program, versión 1.5 y el Trimmed Spearman – Karber (TSK).(58)

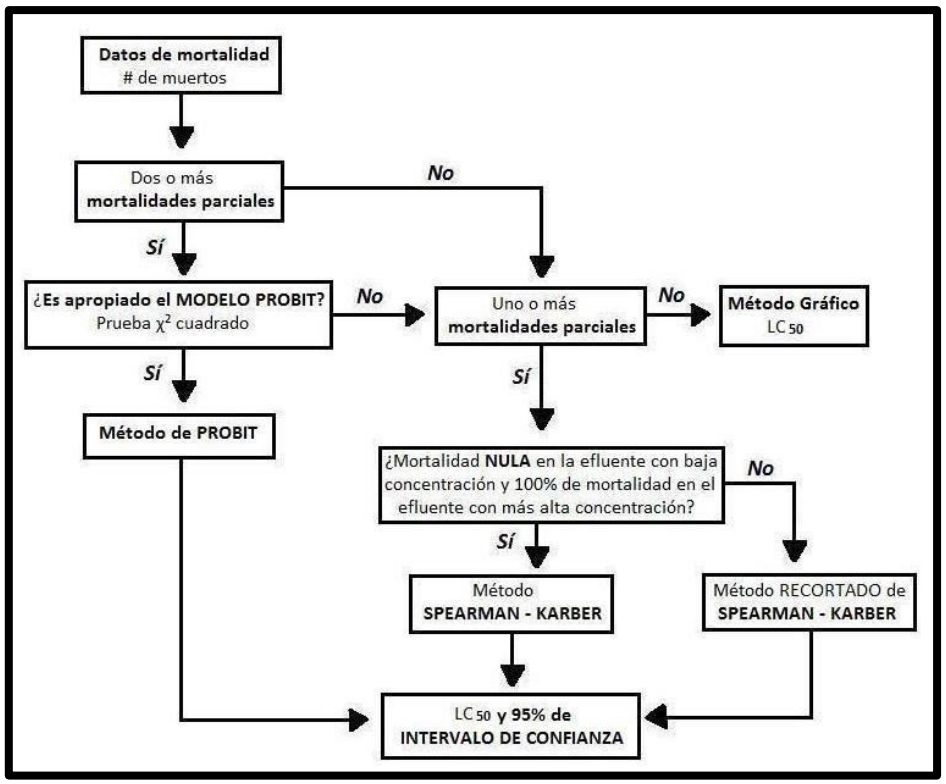


Figura 8. Árbol de decisión para determinar el método a utilizar en el cálculo de CL50%, propuesto por la USEPA (2002)(58).

Bioensayo de toxicidad crónica(64)

Los organismos fueron sometidos a un bioensayo de toxicidad crónica durante 28 días en la cual estuvieron expuestos a nuevas concentraciones considerando los resultados de la prueba de toxicidad aguda. Los organismos recibieron alimento diario y se realizó un recambio diario total de las soluciones de prueba. Cada 7 días de prueba se obtuvo una submuestra del 25% del total de organismos para cuantificar nmoles de TBARS/ mg de proteína con la finalidad de evaluar la variación de la lipoperoxidación cada semana. Se registraron los parámetros fisicoquímicos durante todos los días del bioensayo. Se considero un diseño experimental de bloque completamente aleatorizado (BCA) de 4 x 3 (1 tratamiento control, 3 tratamientos experimentales x 3 réplicas por tratamiento) (Anexo 6).

Tabla 4. Condiciones de bioensayo crónico con FSA diésel en *A. Purpuratus* (28 días).

Tipo de bioensayo	**Estático, renovación cada 24 horas**
Alimentación	*Isochrysis galbana*/*Chaetoceros gracialis* (1:1)
Temperatura	20 ± 2°C
Intensidad luminosa	600-1000 lux en la superficie del líquido
Fotoperíodo	12 horas luz: 12 horas oscuridad
Volumen del recipiente	4 L
Volumen de la solución de prueba	4 L
Organismos	Juveniles de *Argopecten purpuratus* 30 ± 2 mm de longitud
Densidad de organismos	3 organismos/L
Concentraciones	< CL50 (96 horas) de Fracciones solubles de diésel en agua
Número de réplicas	Tres
Control negativo	Agua de mar filtrada
Duración de la prueba	28 días
Efecto medido	nmoles de TBARS/ mg de proteína
Aceptabilidad de los resultados	La mortalidad en el control negativo no debe exceder el 20%

Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se tomaron alícuotas de 1 mL de homogenizados de la branquia y de la glándula digestiva (los cuales se obtienen previamente macerando completamente el tejido en frío, en buffer de fosfatos (PBS 7,4 pH) en una relación 1:5 (w/v) y calentando por 15 minutos en baño maría con 2 mL de una mezcla de ácido tiobarbitúrico (0,375%), ácido tricloroacético (15%) y ácido clorhídrico (0,25 M). Posteriormente, las muestras se centrifugaron (10000 rpm) y se analizaron en un espectrofotómetro a 535 nm.

Para calcular de la cantidad de TBARS en una muestra se emplea la fórmula de “Buege y Aust” (1978) (65):

$$C = \frac{A}{\varepsilon \ x \ P}$$

Dónde:

C = “Concentración de TBARS” (de TBARS)

A = “Absorbancia de la muestra”

ε= “Coeficiente de extinción 1,56 x 10^5 moles/cm”

P= “Grosor de la fotocelda (1 cm)”

El resultado obtenido se expresará en “nmoles de TBARS/mg de proteína”.

En la actualidad, el concepto de "sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico" (TBARS) se ha fusionado y reemplazado progresivamente el ensayo inicial de malondialdehído. En esta investigación, presentamos los resultados como TBARS. Mientras que, la apreciación del estrés oxidativo requerirá la determinación analítica de diferentes moléculas desencadenadas por la acción de los radicales libres. El ensayo TBARS se considera como una prueba global, que permite un enfoque general de la lipoperoxidación, mientras que la determinación específica de malondialdehído (MDA) es uno de los productos formados durante el estrés oxidativo(66).

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford descrito por primera vez en el año 1976, se realizaron modificaciones respecto a los volúmenes a criterio del investigador. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar al 20%. Se realizó la curva de calibración considerando las concentraciones de 5; 2,5; 1; 0,5 y 0,25 µg/mL de BSA(57).

V.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Luego, se realizaron comparaciones entre tratamientos del mismo período de exposición utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. Para datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Se aceptaron diferencias significativas sólo cuando $p \leq 0,05$. Los análisis se realizaron con el software estadístico SPSS 25.

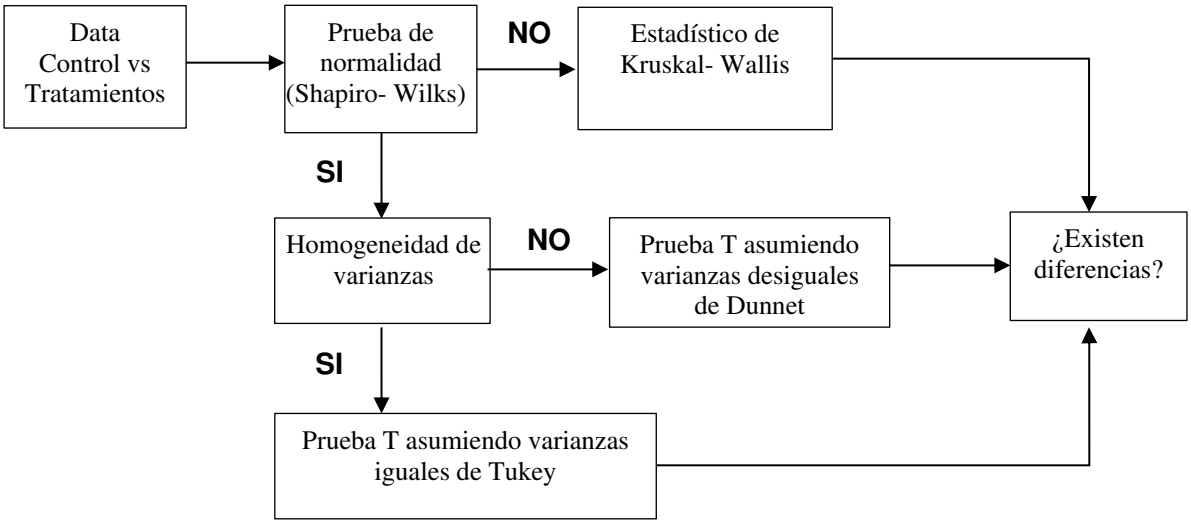


Figura 9. Diagrama de flujo de análisis estadístico de Bioensayo crónico

VI. RESULTADOS

IV.1. PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

La concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en la solución al 100% de FSA (1:4 w/v) fue 30,83 mg/L (ver ANEXO 5), en la Tabla 5 se presentan las concentraciones nominales de HTP empleadas tanto en el bioensayo agudo como crónico:

Tabla 5. Concentraciones nominales de hidrocarburos totales de petróleo empleados en los bioensayos

Bioensayo agudo	
100%	30,830 mg/L
50%	15,415 mg/L
25%	7,708 mg/L
12,5%	3,854 mg/L
6,25%	1,927 mg/L
Bioensayo crónico	
1,6%	0,493 mg/L
0,8%	0,247 mg/L
0,4%	0,123 mg/L

Bioensayo de control positivo con Cloruro de cadmio

Obteniéndose como resultado:

Tabla 6. Bioensayo de control positivo a las 24 horas con $CdCl_2$ en Argopecten purpuratus

CONC (mg/L)	**N° sobrevivientes**	**% vivos**	**% muertos**
control	16	100,00%	0,00%
0,25	16	100,00%	0,00%
0,5	16	100,00%	0,00%
1	16	100,00%	0,00%
2	15	93,75%	6,25%
4	7	43,75%	56,25%

Tabla 7. Bioensayo de control positivo a las 48 horas con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus*

CONC (mg/L)	N° sobrevivientes	% vivos	% muertos
control	16	100,00%	0,00%
0,25	16	100,00%	0,00%
0,5	16	100,00%	0,00%
1	5	31,25%	68,75%
2	1	6,25%	93,75%
4	0	0,00%	100,00%

Tabla 8. Bioensayo de control positivo a las 72 horas con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus*

CONC (mg/L)	N° sobrevivientes	% vivos	% muertos
control	16	100,00%	0,00%
0,25	16	100,00%	0,00%
0,5	13	81,25%	18,75%
1	2	12,50%	87,50%
2	0	0,00%	100,00%
4	0	0,00%	100,00%

Tabla 9. Bioensayo de control positivo a las 96 horas con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus*

CONC (mg/L)	N° sobrevivientes	% vivos	% muertos
control	16	100,00%	0,00%
0,25	16	100,00%	0,00%
0,5	15	93,75%	6,25%
1	2	12,50%	87,50%
2	0	0,00%	100,00%
4	0	0,00%	100,00%

Tabla 10. Determinación de CL50 en bioensayo de control positivo con $CdCl_2$ en *Argopecten purpuratus*

(mg/L)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Total
0	0	0	0	0	16
0,25	0	0	0	1	16
0,5	0	0	3	14	16
1	0	11	14	16	16
2	1	15	16	16	16
4	9	16	16	16	16
METODO	PROBIT	PROBIT	PROBIT	PROBIT	
CL50	3,748	0,942	0,677	0,371	
Límite inferior	3,022	0,766	0,556	0,309	
Límite superior	5,664	0,16	0,825	0,441	

Para la determinación de CL50 a las 96 horas de cloruro de cadmio en los juveniles de *Argopecten purpuratus*, se tomó en cuenta el diagrama de decisión propuesto por la USEPA (58), empleando el método PROBIT, obteniendo un valor de 0,371 mg/L, es decir que a la concentración de 0,371 mg/L de cloruro de cadmio producirá la mortalidad del 50% de organismos de *Argopecten purpuratus* expuestas a 96 horas.

Bioensayo agudo con FSA

Obteniéndose como resultado:

Tabla 11. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 24 horas en *Argopecten purpuratus*

CONC (% FSA)	N° sobrevivientes	% vivos	% muertos
control	40	100,00%	0,00%
6,25	40	100,00%	0,00%
12,5	40	100,00%	0,00%
25	40	100,00%	0,00%
50	40	100,00%	0,00%
100	40	100,00%	0,00%

Tabla 12. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 48 horas en *Argopecten purpuratus*

CONC (% FSA)	N° sobrevivientes	% vivos	% muertos
control	40	100,00%	0,00%
6,25	40	100,00%	0,00%
12,5	40	100,00%	0,00%
25	40	100,00%	0,00%
50	40	100,00%	0,00%
100	40	100,00%	0,00%

Tabla 13. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 72 horas en *Argopecten purpuratus*

CONC (% FSA)	N° sobrevivientes	% vivos	% muertos
control	40	100,00%	0,00%
6,25	40	100,00%	0,00%
12,5	40	100,00%	0,00%
25	40	100,00%	0,00%
50	38	95,00%	5,00%
100	32	80,00%	20,00%

Tabla 14. Bioensayo agudo con FSA de diésel en a las 96 horas en *Argopecten purpuratus*

CONC (% FSA)	N° sobrevivientes	% vivos	% muertos
control	40	100,00%	0,00%
6,25	40	100,00%	0,00%
12,5	40	100,00%	0,00%
25	40	100,00%	0,00%
50	29	72,50%	27,50%
100	4	10,00%	90,00%

Tabla 15. Determinación de CL50 en bioensayo agudo con FSA de diésel en *Argopecten purpuratus*

(%)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Tot.
0	0	0	0	0	40
6,25	0	0	0	0	40
12,5	0	0	0	0	40
25	0	0	0	0	40
50	0	0	2	11	40
100	0	0	8	36	40
METODO	-	-	-	PROBIT	
CL50	-	-	-	62,77	
Límite inferior	-	-	-	55,73	
Límite superior	-	-	-	70,82	

Para la determinación de CL50 a las 96 horas de fracciones solubles de diésel en agua en los juveniles de *Argopecten purpuratus*, también se tomó en cuenta el diagrama de decisión propuesto por la USEPA (58), empleando el método PROBIT, obteniendo un valor de 62,77%, es decir que a una concentración de 62,77% de fracciones solubles en agua causará la mortalidad del 50% de individuos de *Argopecten purpuratus* expuestas durante 96 horas.

Bioensayo de toxicidad crónica

Glándula digestiva

Tabla 8. Pruebas de normalidad de Shapiro- Wilks y Prueba no Paramétrica Kruskal- Wallis en los días de muestreo en glándula digestiva

	Normalidad	**P. no paramétrica**
	Shapiro- Wilks	Kruskal- Wallis
D7	0,004	0,000
D14	0,022	0,000
D21	0,057	0,000
D28	0,020	0,024

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro- Wilks a los valores de nmoles TBARS/mg prot en glándula digestiva durante los días de muestreo de la prueba crónica, el cual dio como resultado que todas las variables no siguen una distribución normal, ($p \leq 0,05$), a excepción del día 21 de muestreo (D21), pero por tratarse de un valor muy cercano a 0,05 y teniendo en consideración el número de muestra al día 21, se consideró como una distribución no normal y se rige a una evaluación de tipo no paramétrica también. Al aplicar el test de Kruskal- Wallis para comparar los tratamientos, se hallaron diferencias significativas, ya que el valor de es $p \leq 0,05$ en todos los días de muestreo.

Branquias

Tabla 9. Pruebas de normalidad de Shapiro- Wilks en los días de muestreo en branquias

	Normalidad
	Shapiro- Wilks
D7	0,358
D14	0,194
D21	0,013
D28	0,020

Se realizo la prueba de normalidad de Shapiro- Wilks a los valores de nmoles TBARS/mg prot en branquias durante los días de muestreo de la prueba crónica, el cual dio como resultado que las variables siguen una distribución normal, (p valor mayor a 0,05), en los días de muestreo D7 y D14, mientras que en los días de muestreo D21 y D28 las variables no siguen una distribución normal (p valor menor a 0,05).

Tabla 10. Pruebas de Homogeneidad de varianzas- branquias en el D7 y D14

	Estadístico de Levene	**Sig.**
D7	0,522	0,671
D14	3,294	0,041

Se realizó la prueba de Homogeneidad de varianzas para los días D7 y D14, obteniéndose como resultado que las varianzas son iguales para el D7 con una significancia mayor de 0,05 y para D14 las varianzas son desiguales con una significancia menor de 0,05.

Tabla 11. Prueba Tukey- branquias en el D7

Concentración	Concentración	Sig.
0,0	0,4	0,000
	0,8	0,000
	1,6	0,000
0,4	0	0,000
	0,8	0,000
	1,6	0,000
0,8	0	0,000
	0,4	0,000
	1,6	0,000
1,6	0	0,000
	0,4	0,000
	0,8	0,000

Se realizó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples asumiendo que las varianzas son iguales en el D7, obteniendo una significancia menor a 0,05 en todas las comparaciones entre tratamientos.

Tabla 12. Prueba T3 Dunnet- branquias en D14

Concentración	Concentración	Sig.
0,0	0,4	0,011
	0,8	0,001
	1,6	0,000
0,4	0	0,000
	0,8	0,999
	1,6	0,003
0,8	0	0,000
	0,4	0,999
	1,6	0,000
1,6	0	0,000
	0,4	0,003
	0,8	0,000

Se realizó la prueba de T3 Dunnet para comparaciones múltiples asumiendo que las varianzas son desiguales en el D14, obteniendo una significancia menor a 0,05 en todas las comparaciones entre tratamientos, excepto en las concentraciones 0,4 y 0,8 %, esto evidenciaría que en el día 14 de exposición crónica no existen diferencias significativas entre las concentraciones de 0,4 y 0,8 %.

Tabla 13. Prueba Kruskal- Wallis- branquias en D21 y D28

	P. no paramétrica
	Kruskal- Wallis
D21	0,034
D28	0,024

Al aplicar el test de Kruskal- Wallis para comparar los tratamientos en el D21 y D28, se hallaron diferencias significativas, ya que el valor de P es inferior a 0,05.

Tabla 14. Valores de lipoperoxidación y proteínas en glándula digestiva de *A. purpuratus* expuestas al 0,4; 0,8 y 1,6% de FSA en los días 7, 14, 21 y 28.

Tejido	Tiempo (días)	n=	Concentración (% FSA)	Proteínas (µg/mL)*	Lipoperoxidación (nmol TBARS/g)**	Lipoperoxidación (nmol TBARS/mg prot)***
Glándula digestiva	7	7	Control	4,26 ± 0,42	17,9 ± 1,8	92,01 ± 8,66
		7	0,4	4,55 ± 0,29	27,25 ± 2,20	134, 57 ± 5,77[a]
		7	0,8	4,55 ± 0,29	36,27 ± 3,19	156,71 ± 5,11[a]
		7	1,6	4,52 ± 0,13	35,50 ± 1,13	164,08 ± 3,45[a]
	14	7	Control	4,61 ± 0,29	14,64 ± 1,52	84,95 ± 2,06
		4	0,4	4,61 ± 0,21	25,92 ± 2,18	130,62 ± 2,27[a]
		7	0,8	4,63 ± 0,13	37,04 ± 1,87	150,96 ± 3,12[a]
		7	1,6	4,55 ± 0,29	37,05 ± 3,05	201,30 ± 12,15[a]
	21	7	Control	4,81 ± 0,23	15,74 ± 1,19	85,37 ± 2,22
		4	0,4	4,62 ± 0,18	24,49 ± 1,41	131,14 ± 4,07[a]
		7	0,8	4,59 ± 0,18	29,27 ± 2,09	162,54 ± 4,76[a]
		7	1,6	4,52 ± 0,32	39,94 ± 4,1	204,97 ± 11,18[a]
	28	6	Control	4,53 ± 0,11	14,83 ± 0,95	92,24 ± 2,25
		4	0,4	4,57 ± 0,25	27,45 ± 2,53	137,77 ± 4,20[a]
		7	0,8	4,56 ± 0,17	33,72 ± 2,75	171,39 ± 4,55[a]
		2	1,6	4,67 ± 0,20	40,45 ± 1,75	197,95 ± 4,17[a]

Los datos están expresados como media ± desviación estándar.

*µg de proteínas por cada mL de muestra

**nmol de TBARS por g de tejido húmedo

***nmol de TBARS por mg de proteína

[a] diferencias significativas comparados con el control

En la figura 11, se muestra la representación del diagrama de cajas y bigotes de los valores de nmol TBARS /mg proteína (peroxidación lipídica) en glándula digestiva de juveniles Argopecten purpuratus expuestos a agua de mar filtrada como control, (color azul); 0,4% de FSA (color anaranjado); 0,8% de FSA (color plomo) y 1,6% de FSA (color amarillo) durante un periodo de 7, 14, 21 y 28 días.

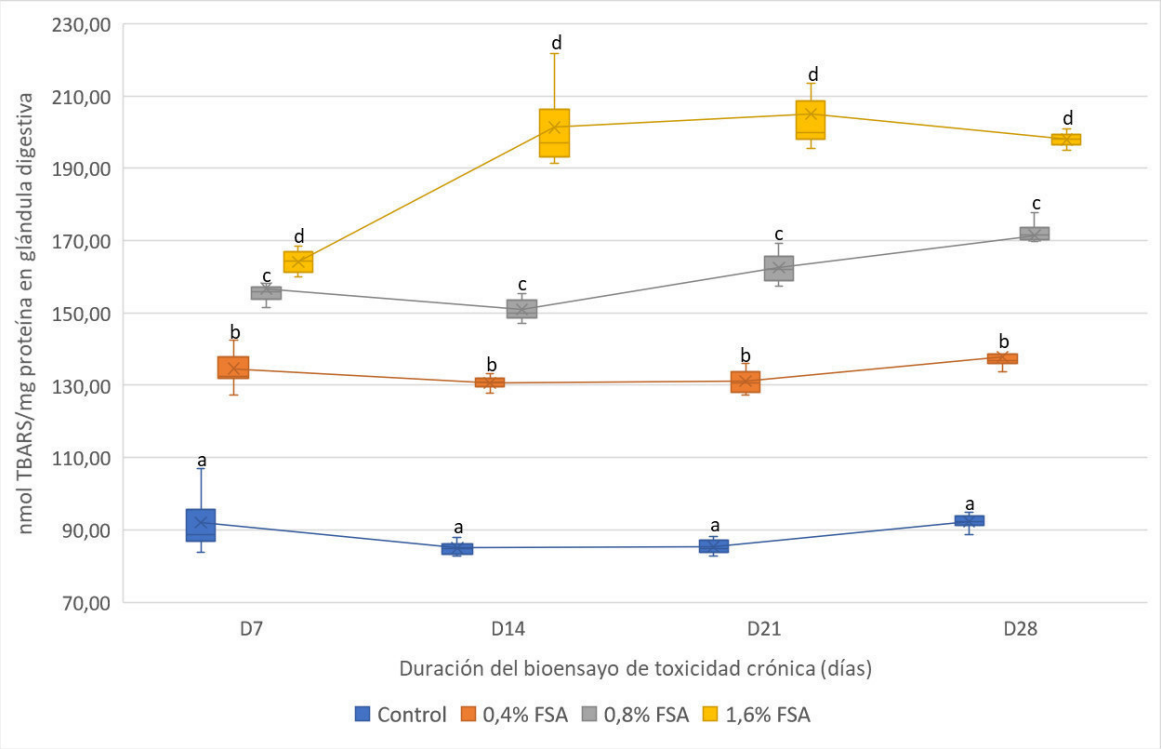


Figura 11. Valores de lipoperoxidación en glándula digestiva de *Argopecten purpuratus.* Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes. La comparación se realizó entre grupos expuestos durante el mismo tiempo.

Para la representación se realiza la distribución de datos de cada grupo mediante cuartiles, evidenciando una diferencia entre los tratamientos, lo mismo que se corroboró mediante la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis con un $p<0,05$, además se muestra una línea de tendencia de característica ascendente que representa el incremento de los valores de TBARS en relación al tiempo para cada concentración, excepto para la concentración de 1,6% FSA donde a partir del D14, se evidencia un comportamiento constante hasta el día 21, para posteriormente descender al día 28, estos valores están estrechamente ligado al efecto tóxico producido por FSA, representado en la mortalidad de los juveniles de *Argopecten purpuratus*, como indica el conteo de individuos de la tabla 14. Es importante destacar también la diferencia significativa de todas las concentraciones de experimentación con respecto al control.

Tabla 15. Valores de lipoperoxidación y proteínas en glándula digestiva de *A. purpuratus* expuestas al 0,4; 0,8 y 1,6% de FSA en los días 7, 14, 21 y 28.

Tejido	Tiempo (días)	n=	Concentración (% FSA)	Proteínas (µg/mL)*	Lipoperoxidación (nmol TBARS/g)**	Lipoperoxidación (nmol TBARS/mg prot)***
Branquias	7	7	Control	4,25 ± 0,33	5,58 ± 0,68	42,18 ± 2,41
		7	0,4	4,39 ± 0,29	6,66 ± 1,09	51,02 ± 2,76[a]
		7	0,8	4,64 ± 0,22	9,11 ± 1,58	59,88 ± 2,36[a]
		7	1,6	4,54 ± 0,23	10,97 ± 1,07	74,33 ± 2,24[a]
	14	7	Control	4,63 ± 0,18	5,33 ± 1,2	38,72 ± 2,11
		4	0,4	4,52 ± 0,43	6,52 ± 0,59	53,46 ± 4,06[a]
		7	0,8	4,87 ± 0,41	7,40 ± 0,54	52,45 ± 5,03[a]
		7	1,6	4,96 ± 0,39	9,64 ± 0,96	69,00 ± 5,46[a]
	21	7	Control	4,72 ± 0,20	6,24 ± 1,07	44,73 ± 2,86
		4	0,4	4,46 ± 0,20	9,2 ± 0,93	63,66 ± 2,25[a]
		7	0,8	4,59 ± 0,08	11,32 ± 1,33	82,04 ± 4,06[a]
		7	1,6	4,29 ± 0,11	11,59 ± 1,79	81,55 ± 1,96[a]
	28	6	Control	4,45 ± 0,17	4,61 ± 0,49	36, 73 ± 1,50
		4	0,4	4,50 ± 0,15	11,65 ± 1,60	75,47 ± 2,28[a]
		7	0,8	4,55 ± 0,16	11,94 ± 1,36	84,63 ± 1,17[a]
		2	1,6	4,55 ± 0,25	18,90 ± 2,23	118,42 ± 1,08[a]

Los datos están expresados como media ± desviación estándar.
*µg de proteínas por cada mL de muestra
**nmol de TBARS por g de tejido húmedo
***nmol de TBARS por mg de proteína
[a] diferencias significativas comparados con el control

En la figura 12, se muestra la representación del diagrama de cajas y bigotes de los valores de nmol TBARS /mg proteína, como biomarcador de lipoperoxidación en branquias de juveniles de *Argopecten purpuratus* expuesta al agua de mar filtrada como control, (color azul); 0,4% de FSA (color anaranjado); 0,8% de FSA (color plomo) y 1,6% de FSA (color amarillo) durante un período de 7, 14, 21 y 28 días.

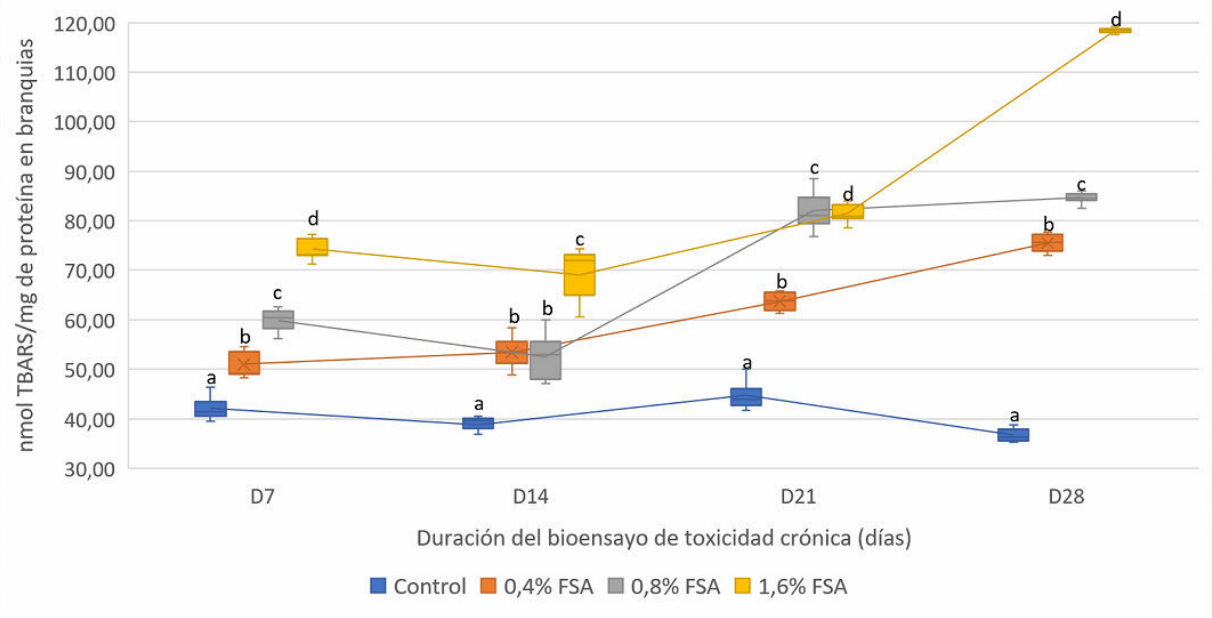


Figura 12. Valores de lipoperoxidación en branquias de *Argopecten purpuratus.* Los grupos con la misma letra no son estadísticamente diferentes. Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes. La comparación se realizó entre grupos expuestos durante el mismo tiempo.

Se evidencio una diferencia entre los tratamientos, lo mismo que se corroboró mediante la prueba paramétrica de Tukey para el D7 con un $p<0,05$, mientras que para el D14 mediante la prueba paramétrica de T3 Dunnet se corroboró que los tratamientos de 0,4 y 0,8% de FSA se comportan igual con $p>0,05$, para finalmente evidenciar diferencias en los tratamientos a los D21 y D28 corroborado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis con un $p<0,05$.

Se muestra una línea de tendencia independiente para cada concentración durante el transcurso de los días, mientras que para el control la línea de tendencia se mantiene ligeramente estable. La tendencia para la concentración de 0,4% de FSA fue ascendente, lo cual representa el incremento de los valores de TBARS en relación al tiempo para dicha concentración. En cuanto a la concentración de 0,8% de FSA, la concentración desciende al día 14, para luego ascender al día 21 y aumentar ligeramente en el día 28. Finalmente, la tendencia de 1,6% de FSA fue descendente al día 14 para luego evidenciar un comportamiento constante de ascenso desde el día 21 hasta el día 28, estos valores están estrechamente ligado al efecto tóxico producido por FSA, representado en la mortalidad de los juveniles de *Argopecten purpuratus*, según el conteo de individuos de la tabla 15.

V. DISCUSIÓN

Las aguas marinas costeras reciben cantidades de desechos industriales, agrícolas, domésticos y la exposición a contaminantes puede inducir diversos efectos biológicos en los pectínidos, estos pueden estar expuestos directamente a contaminantes disueltos y/o particulados en la columna de agua o expuestos indirectamente a través de sus fuentes de alimentos(67,68).

Los pectínidos han recibido una considerable atención en estudios de distribución de contaminantes y efectos biológicos debido a que sus características sedentarias lo mantienen expuestos a contaminantes, además de su amplia distribución geográfica, su aparentemente alta sensibilidad a una amplia gama de contaminantes y alto valor comercial, lo vuelve un organismo importante para investigaciones(69). Actualmente existe la tendencia en el uso y estudio de pectínidos en el monitoreo ambiental con un uso cada vez mayor como bioindicadores y biomarcadores de la salud del ecosistema(70).

Actualmente existen recomendaciones relacionados a los procedimientos preliminares propuesto por la USEPA en su manual; “Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms” (58) en el cual indica que la realización del bioensayo de control positivo o tóxico de referencia se realiza con seis diferentes compuestos, dentro de las cuales destaca el cloruro de cadmio, estos compuestos se utilizan para determinar la “sensibilidad” de las especies utilizadas en bioensayos de toxicidad. Además, se emplean para asegurar el impacto en organismos expuestos a determinadas sustancias tóxicas, no por cambios en la sensibilidad del organismo o errores operativos en el proceso de bioensayo ecotoxicológico. Diversos autores aplican esta recomendación, por ejemplo, Sobrino et al, reporta que la CL50 para *Argopecten ventricosus* fue de 0,44 mg/L y 0,396 mg/L de cadmio a tiempos de exposición continua de 72 y 96 horas(71). Asimismo para un tiempo de 96 horas Murillo- Romero evidencian una CL50 de 0,48 mg/L de cadmio para juveniles de *Argopecten purpuratus* y Rajkumar J.S.I una CL50 de 0,95 mg/L de cadmio para juveniles de *Perna viridis* (72,73). Para el bioensayo del presente estudio se utilizó cloruro de cadmio ($CdCl_2$) determinando una CL50 de 3,748; 0,942; 0,677 y 0,371 mg /L de $CdCl_2$ para las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente, mediante el método

PROBIT(58), teniendo en cuenta los resultados, se evidenció una relación inversamente proporcional entre el tiempo de exposición y la concentración letal media, además que Argopecten purpuratus mostro mayor sensibilidad para cloruro de cadmio frente a *Argopecten ventricosus y Perna viridis*.

El diésel al igual que la gasolina se emplean ampliamente como combustible para motores. Los motores que emplean diésel como combustible muestran mayor eficiencia que los motores que emplean gasolina debido a que se aprovecha más o menos el 35% de energía liberada por combustión, en comparación con los motores de gasolina que solo aprovechan un 25% de la energía(74).

La composición del diésel es compleja, debido a la cantidad de hidrocarburos que se encuentran en él, lo cual dificulta su medición individual, sin embargo, resulta más práctico la cuantificación total de hidrocarburos presentes en una muestra particular, como hidrocarburos totales de petróleo (TPH's). La versatilidad de compuestos que conforman el grupo de los TPH's, complica definir su grado de toxicidad para la salud humana y ambiental. En una cuantificación en sedimento o agua, su fraccionamiento en diferentes rangos de carbono no proporciona información directa sobre ello, sin embargo, facilita su análisis y permite estimar su riesgo(75). Además, el diésel contiene habitualmente aditivos, y estos aditivos pueden contribuir a la toxicidad de fracción soluble de diésel en agua, como propuesto por Neff et al. (76) y González-Doncel et al.(77)

En el bioensayo de toxicidad aguda de las fracciones solubles de diésel en agua frente a *Argopecten purpuratus* "concha de abanico", se realizó la exposición a cinco concentraciones de 6,25; 12,5; 25; 50 y 100% de fracciones soluble de diésel en agua en un tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas, además se utilizó agua de mar filtrada como control negativo, donde se incluyeron 10 juveniles por cada grupo experimental; el ensayo se realizó con cuatro réplicas. En la investigación se registró la ausencia de mortalidad de los individuos a tiempos de exposición de 24, 48 y 72 horas, se observó que durante estos periodos de tiempo los organismos mantuvieron cerradas sus valvas, este efecto denominado "cierre valvar" ha sido explicado como un mecanismo de defensa propia para bivalvos(78,79). Es así, como en los juveniles de *Argopecten purpuratus* se evidenció el cierre de las valvas

en los tratamientos de diésel durante las 72 horas de exposición, debido a que *Argopecten purpuratus* es una especie intermareal, por consiguiente está condicionada a mantenerse durante largos períodos de tiempo, afuera del mar, por lo cual el "cierre valvar" es una respuesta empleada frente a condiciones desfavorables por ejemplo: altas concentraciones de metales pesados, períodos de bajas concentraciones de alimentos(80). Aunque el comportamiento es difícil de evaluar cuantitativamente, sin embargo, es una respuesta adaptativa muy compleja a modificaciones ambientales(81). En consecuencia, cualquier modificación en el patrón de comportamiento afectaría la capacidad del organismo para adaptarse al medio ambiente.

En la exposición por 96 horas, se determinó la letalidad CL50 mediante el método PROBIT(58), obteniéndose una concentración letal media de 62,77% de FSA equivalentes a 18,8 ppm de fracción soluble de diésel en agua en los juveniles de *Argopecten purpuratus*. Investigadores reportan la letalidad en organismos como larvas de *Odontesthes argentinensis "*pejerrey marino"(20), *Oreochromis niloticus "*tilapia"(82), con valores de CL50 a las 96 horas de 13,46% y 8,08 ppm, respectivamente.

Además, se reportan efectos específicos como la inhibición del crecimiento poblacional en diatomea *Chaetoceros gracilis* a un tiempo de exposición de 96 horas con un CE50 de 90 mg/L de fracción soluble de diésel 2(50), por otro lado, Müller et al., reportaron la inhibición de la movilidad en el microcrustáceo *Daphnia magna* a un tiempo de exposición de 48 horas con un CE5048h de 39,6% de fracción soluble de diésel en agua(83).

A pesar de la dificultad para realizar un contraste directo de los resultados con otras investigaciones; se realizó la comparación con organismos de prueba que pertenecen a distintos niveles tróficos y están expuestos en medios de diferente composición, por ejemplo, el origen del hidrocarburo. A pesar de estas diferencias, los resultados son consistentes con los trabajos de investigación consultados(20,50,82,83), ya que todos los estudios demostraron el potencial de la

fracción soluble de diésel en agua para ejercer efectos agudos ecotoxicológicos elevados en diferentes organismos acuáticos.

Para la elección de las concentraciones apropiadas para el bioensayo de toxicidad crónica, se toman en cuenta efectos nutricionales, factores fisiológicos, factores fisicoquímicos, mecanismo de acción del toxico, NOEL, RAC (ratio agudo/crónico)(84,85).

Se ha propuesto que, en ausencia de información específica sobre los efectos crónicos de una sustancia o compuesto, la concentración de un tóxico que sea lo suficientemente seguro para una especie acuática en particular, se calcule multiplicando el valor de la CL50 hallada a partir de un bioensayo de exposición aguda para esa misma especie en la misma matriz por el factor de aplicación apropiado(86).

Se han publicado factores de aplicación recomendados relacionados con varios contaminantes tóxicos (Academia Nacional de Ciencias-Academia Nacional de Ingeniería, 1973), pero muchos de ellos se basan en datos experimentales muy limitados y requieren ser verificados. La mayoría de estos valores se encuentran dentro del rango de 0,01 a 0,10. Es decir, el nivel "seguro" puede estimarse entre 0,01 y 0,10 de la CL50(87).

Por consiguiente, se procedió a instalar un bioensayo crónico preliminar con concentraciones 6,25 y 3,12% de FSA de diésel, se evidenció que a estas concentraciones se registró una mortalidad del 20,4% en los primeros siete días de exposición en las concentraciones de experimentación, contrariamente a lo propuesto por la Academia Nacional de Ciencias- Academia Nacional de Ingeniería, un factor de aplicación del 0,10 de la CL50 no aseguraría la supervivencia de las especies durante un bioensayo crónico donde se pretenden evaluar efectos subletales. Esto podría explicarse debido a la naturaleza del tóxico empleado, tanto el crudo como sus derivados debido su elevada afinidad por los lípidos tienden a acumularse en el tejido graso del organismo para luego liberarse paulatinamente al torrente sanguíneo(88). Así mismo, a partir de una evaluación sistemática de los

ACR (ratio agudo crónico) para diferentes niveles tróficos, realizada por Ahlers y col(86), reveló que los datos agudos solo tienen un valor predictivo limitado de los efectos a largo plazo en los ecosistemas acuáticos y se puede lograr una predicción conservadora de la toxicidad a largo plazo mediante bioensayos y en diferentes ciclos de vida.

A diferencia del bioensayo de toxicidad aguda en el cual la supervivencia de los juveniles de *Argopecten purpuratus* fue del 76,25%, el organismos biológico al estar expuesto a altas concentraciones del agente tóxico evidencio el cierre valvar como mecanismo de defensa a la exposición (74, 75); mientras que durante el bioensayo de toxicidad crónica se evidenció que los juveniles de *Argopecten purpuratus* mantuvieron una actividad normal respecto al movimiento de sus valvas y cilios del manto, además se observó una diferencia entre la filtración de alimento según el color de cada unidad de investigación según Anexo 4 por consiguiente se observó mayor cantidad de heces (Anexo 5) en el grupo control y tratamiento de concentración 0,4% que en los tratamientos de mayor concentración 0,8 y 1,6%, esto fundamentado por la baja concentración de FSA en el medio y presencia de alimento para mantener el bioensayo.

En el bioensayo de toxicidad crónica se utilizaron los tejidos de glándula digestiva y branquias, con la finalidad de evaluar el tejido con mayor sensibilidad frente a la exposición crónica de FSA, determinando los valores de TBARS como principal indicador de peroxidación lipídica. En el primer corte (séptimo día) se evidenció valores de 92,01 ± 8,66; 134,57 ± 5,77; 156,71 ± 5,11 y 164,08 ± 3,45 nmol TBARS/mg prot, para los grupos control, 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA en la glándula digestiva, mientras que en las branquias se presentaron valores de 42,18 ± 2,41; 51,02 ± 2,76; 59,88 ± 2,36 y 74,33 ± 2,24 nmol TBARS/mg prot, en concentraciones de 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA, respectivamente.

En el segundo corte (decimocuarto día) se evidenció valores de 984,95 ± 2,06; 130,62 ± 2,27; 150,96 ± 3,12 y 201,30 ± 12,15 nmol TBARS/mg prot, para los grupos control, 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA en la glándula digestiva, por otro lado, en las branquias se evidenciaron valores de 38,72 ± 2,11; 53,46 ± 4,06; 52,45 ± 5,03 y 69,00 ± 5,46 para los grupos control, 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA, respectivamente.

En el tercer corte (vigésimo primer día) se evidenció valores de 85,37 ± 2,22; 131,14 ± 4,07; 162,54 ± 4,76 y 204,97 ± 11,18 nmol TBARS/mg prot, para los grupos control, 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA en la glándula digestiva.

En el cuarto corte (vigésimo octavo día) se evidenció valores de 92,01 ± 8,66; 134,57 ± 5,77; 156,71 ± 5,11 y 164,08 ± 3,45 nmol TBARS/mg prot, para los grupos control, 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA para la glándula digestiva.

Al evaluar la lipoperoxidación midiendo los valores del biomarcador (TBARS) en dos tejidos, se evidenció un mayor daño en la glándula digestiva en comparación a las branquias. Tal como lo describe Fassiano y col(89), quienes determinaron el daño oxidativo a los lípidos en tejidos como “glándulas oviductales”, “sistema nervioso”, “branquias”, “brazo”, “manto”, “sifón” y “glándula digestiva” usando el modelo animal de cefalópodo *Octopus tehuelchus*, evidenciaron que la mayor cantidad de TBARS se obtuvieron en “glándula digestiva”; sin embargo, en todos los tejidos estudiados se cuantificaron valores medibles. Del mismo modo, Almeida y col, compararon los valores de peroxidación lipídica en los bivalvos *Perna* (90) y *Mytilus galloprovincialis*(91), evidenciando una mayor cuantificación en “glándula digestiva”, esto podría explicarse debido a que los tejidos de la glándula digestiva poseen mayores valores de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que las branquias(89), lo cual incrementa los valores de peroxidación lipídica.

Debido a que los parámetros de “estrés oxidativo” aún no han sido estudiados en este tipo de bivalvo y que, en varios organismos, los contaminantes producen estrés oxidativo, es esencial estudiar su mecanismo de acción, para así comenzar a caracterizar las alteraciones metabólicas y fisiológicas asociadas a su mecanismo de acción.

VI. CONCLUSIONES

- El contenido de Hidrocarburos Totales de Petróleo mediante el método 8015c de la EPA fue del 30,83 mg/L siendo un método eficaz para cuantificar hidrocarburos totales de petróleo en agua de mar
- La concentración letal media (CL50) para juveniles de *Argopecten purpuratus* fue de 0,371 mg/L de Cloruro de cadmio a las 96 horas de exposición.
- La concentración letal media (CL50) para juveniles de *Argopecten purpuratus* fue de 62,77% de Fracciones Solubles de Diesel a las 96 horas de exposición.
- La concentración promedio de TBARS en glándula digestiva fue 92,01 ± 8,66; 134,57 ± 5,77; 156,71 ± 5,11 y 164,08 ± 3,45 nmol TBARS/mg prot, para los grupos control, 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA respectivamente, mientras que en las branquias presentó valores de 42,18 ± 2,41; 51,02 ± 2,76; 59,88 ± 2,36 y 74,33 ± 2,24 nmol TBARS/mg prot, a concentraciones de 0,4; 0,8 y 1,6 % FSA, respectivamente.
- La glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* presentó una mayor sensibilidad a la exposición crónica de Fracciones Solubles de Diesel, al evidenciar un incremento aproximado del doble del contenido de TBARS en comparación a las branquias *Argopecten purpuratus*.

VII. RECOMENDACIONES

- Aumentar la cantidad de individuos por replica.
- Cuantificar hidrocarburos aromáticos, trazas de metales pesados y BTEX en la solución madre de fracción soluble de diésel en agua.
- Cuantificar hidrocarburos aromáticos, trazas de metales pesados y BTEX en los tejidos de músculo aductor y gónadas, al ser estos consumidos por el hombre.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farrington JW. Oil pollution in the marine environment III: Fates and effects of chronic oil inputs. Environment. 2014;56(5):12–25.
2. Wang C, Zou X, Gao J, Zhao Y, Yu W, Li Y, et al. Pollution status of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from the Yangtze River Estuary and its adjacent coastal zone. Chemosphere [Internet]. 2016;162:80–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.075
3. Cardoso FD, Dauner ALL, Martins CC. A critical and comparative appraisal of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended particulate material from a large South American subtropical estuary. Environ Pollut. 2016;214:219–29.
4. Dauner ALL, Hernández EA, MacCormack WP, Martins CC. Molecular characterisation of anthropogenic sources of sedimentary organic matter from Potter Cove, King George Island, Antarctica. Sci Total Environ [Internet]. 2015;502:408–16. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.043
5. TRUHAUT R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. Eval Toxicol Data Prot Public Heal. 1977;373–413.
6. Liu F, Yang Q, Hu Y, Du H, Yuan F. Distribution and transportation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at the Humen river mouth in the Pearl River delta and their influencing factors. Mar Pollut Bull [Internet]. 2014;84(1–2):401–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.045
7. Bhagat J, Sarkar A, Ingole BS. DNA Damage and Oxidative Stress in Marine Gastropod Morula granulata Exposed to Phenanthrene. Water Air Soil Pollut. 2016;227(4):114–26.
8. Cheung CCC, Siu WHL, Richardson BJ, De Luca-Abbott SB, Lam PKS. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, Perna viridis. Environ Pollut. 2004;128(3):393–403.
9. Gómez SE, Giusto A, Beltrami CR, Naya JG. Resistencia a diversos combustibles derivados del petroleo en Cnesterodon decemmaculatus (Pisces, Cyprinodontiformes). Bioikos. 2003;17(Mc):57–64.
10. Prada Ríos JE, Zambrano Ortiz MM. Toxicidad Aguda y Bioacumulación de

dos Hidrocarburos aromáticos Policíclicos (Naftaleno y Fluoranteno) en un molusco Bivalvo. Boletín Científico CCCP. 2006;13(13):53–64.

11. Omoregie E, Ufodike BC. Effects of water soluble fractions of crude oil on growth of the Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.). Bull Environ Contam Toxicol. 2000;64(4):601–5.
12. Sabatini SE, Calcagno J. Los moluscos como bioindicadores. Los invertebrados Mar. 2014;(1):193–6.
13. Elder JF, Collins JJ. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. Rev Environ Contam Toxicol. 1991;122:37–79.
14. Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol. 2007;146(3):281–300.
15. Markert Bernd A. Breure Anton M. Zechmeister Harald G. Molluscs as bioindicators. In: G. MBABAMZH, editor. Bioindicators and biomonitors. 1st ed. Londres: Elsevier Science Ltd.; 2003. p. 577–84.
16. Ansaldo M, Najle R, Luquet CM. Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet Nacella concinna. Mar Environ Res. 2005;59(4):381–90.
17. Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello MF, Marinosci L, Schettino T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in Mytilus galloprovincialis and Mullus barbatus in an Italian coastal marine area. Mar Pollut Bull. 2003;46(3):324–30.
18. Zhang JF, Wang XR, Guo HY, Wu JC, Xue YQ. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, Carassius auratus. Ecotoxicol Environ Saf. 2004;58(1):110–6.
19. Bettim FL, Galvan GL, Cestari MM, Yamamoto CI, Silva de Assis HC. Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. Chemosphere [Internet]. 2016;144(0):1467–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.109
20. Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA,

Sampaio LA. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey Odontesthes argentinensis larvae. Sci Total Environ [Internet]. 2010;408(9):2054–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.063

21. IOGP. Impactos de los derrames de hidrocarburos sobre la ecología marina: Directrices de buenas prácticas para el personal de manejo de impactos y respuesta a emergencias [Internet]. 2015. Available from: http://www.oilspillresponseproject.org/wp-content/uploads/2017/02/Marine-ecology_SP.pdf
22. Saeed T, Al-Mutairi M. Chemical composition of the watersoluble fraction of the leaded gasolines in seawater. Environ Int. 1999;25(1):117–29.
23. Fingas M, Fieldhouse B. Studies of the formation process of water-in-oil emulsions. Mar Pollut Bull. 2003;47(9–12):369–96.
24. Speight JG. Environmental Effects of Hydrocarbons. In: Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes. 2011. p. 539–76.
25. Acuña-González J, Vargas-Zamora JA, Gómez-Ramírez E, García-Céspedes J. Hidrocarburos de petróleo, disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. Rev Biol Trop [Internet]. 2004 [cited 2021 Jan 15];52:43–50. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000600005&lng=en&nrm=iso&tlng=
26. Fingas M. Oil and Petroleum Evaporation. Handbook of Oil Spill Science and Technology. 2015. 205–223 p.
27. The International Tanker Owner Pollution Federation Limited. Observación aérea de derrames de hidrocarburos en el mar. Documento de información técnica. 2011.
28. Patel AB, Shaikh S, Jain KR, Desai C, Madamwar D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. Front Microbiol. 2020;11(November).
29. Das N, Chandran P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Biotechnol Res Int. 2011;2011:1–13.
30. Lee K, Boufadel M, Chen B, Foght J, Hodson P, Swanson S, et al. Expert Panel Report on the Behaviour and Environmental Impacts of Crude Oil

Released into Aqueous Environments. 1st ed. Lee K, editor. Royal Society of Canada. Ottawa: Royal Society of Canada; 2015. 489 p.

31. Derecho P De, Privado I. Foro Jurídico -35. 2002;35–52.
32. Pacheco M, Santos MA. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of Anguilla anguilla L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicol Environ Saf. 2001;49(1):64–75.
33. Teles M, Pacheco M, Santos MA. Anguilla anguilla L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-tranferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β-naphthoflavone. Ecotoxicol Environ Saf. 2003;55(1):98–107.
34. Mendo J, Wolff M, Mendo T, Ysla L. Scallop Fishery and Culture in Peru. In: Developments in Aquaculture and Fisheries Science [Internet]. Elsevier B.V.; 2016. p. 1089–109. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62710-0.00028-6
35. Shumway SE, Cucci TL, Newell RC, Yentsch CM. Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. J Exp Mar Bio Ecol. 1985;91(1–2):77–92.
36. Alcázar Zamora JA, Mendo Aguilar J. Crecimiento y supervivencia de juveniles de Argopecten purpuratus en sistemas de fondo y suspendido en la zona de Casma, Perú. Ecol Apl. 2008;7(1–2):71.
37. Tarazona J, Espinoza R, Solís M, Arntz W. Crecimiento y producción somática de la concha de abanico (Argopecten purpuratus) en Bahía Independencia, Pisco (Perú) comparados entre eventos El Niño y La Niña. Rev Biol Mar Oceanogr. 2007;42(3):275–85.
38. FAO. Estado Actual Del Cultivo Y Manejo De Moluscos Bivalvos Y Su Proyeccion Futura. 2010;
39. Mendo J, Wolff M. El impacto de el niño sobre la producción de concha de abanico (Argopecten purpuratus) en bahía independencia,Pisco, Perú. Ecol Apl. 2016;2(1–2):51.
40. Ricardo Bandin L, Jaime Mendo A. Asentamiento larval de la concha de abanico (Argopecten purpuratus) en colectores artificiales en la Bahía Independencia, Pisco, Perú. Investig Mar. 1999;27(1999):3–13.
41. Produccion M de la. Anuario estadistico pesquero y acuicola 2019. Lima;

2019.

42. Kroon F, Streten C protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic reviewlaire, Harries S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. PLoS One. 2017;12(4):1–43.
43. Gagne F. Biochemical Ecotoxicology. 1st ed. Gagne F, editor. Quebec; 2014. 33–45 p.
44. Quintanar Escorza MA, Calderón Salinas JV. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. Rev Educ Bioquímica. 2009;28(3):89–101.
45. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. Nutr J [Internet]. 2016;15(1):1–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5
46. Jaramillo F, Valdivia A. Fundamentos del estrés oxidativo celular. 1era ed. Fundamentos del estrés oxidativo celular. Aguas calientes; 2016. 23–42 p.
47. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med. 1990;9(6):515–40.
48. Braga MA, Brauko KM, Vicentini M, Salgado LD, Silva de Assis HC, Dolatto RG, et al. Cytotoxicity and enzymatic biomarkers as early indicators of benthic responses to the soluble-fraction of diesel oil. Ecotoxicol Environ Saf [Internet]. 2018;164(0):21–31. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.084
49. Lister KN, Lamare MD, Burritt DJ. Oxidative damage and antioxidant defence parameters in the Antarctic bivalve Laternula elliptica as biomarkers for pollution impacts. Polar Biol. 2015;38(10):1741–52.
50. Vera G, Tam J, Pinto E. Efectos ecotoxicologicos del petroleo crudo, diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga Chaetoceros gracilis Schutt. Ecol Apl. 2009;8(1–2):1.
51. Alayo M, Iannacone J. Ensayos ecotoxicologicos con petroleo crudo, diesel 2 y diesel 6 con dos subespecies de Brachionus plicatilis müller 1786 (rotifera: monogononta). Gayana (Concepción) [Internet]. 2002 [cited 2021 Jan 11];66(1):45–58. Available from:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382002000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=en

52. Montes R. Efecto Ecotoxicologico Del Petróleo Crudo Sobre El Primer Estadio De Emerita Analoga Stimpson , 1857 (Decápoda : Anomura) Ecotoxicological Effect of Crude Oil on the First Stage of Emerita Analoga Stimpson , 1857 (Decapoda : Anomura). Biologist. 2008;6:101–11.
53. Ram P, Cant AM. Introduccion. In: Morales GC, Rojas Bracho L, Ramírez MY, editors. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México. 1era ed. México, D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 2008. p. 5–12.
54. Ekelund NGA, Häder DP. Environmental monitoring using bioassays. In: Bioassays: Advanced Methods and Applications. 2018. p. 419–37.
55. Häder DP. Historical development of bioassays. In: Bioassays: Advanced Methods and Applications. 2018. p. 41–9.
56. Sánchez G, Vera G. Manual Introductorio de Ecotoxicologia Acuatica. Vol. 161, Instituto del Mar del Perú. 2001.
57. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 1994. p. 9–15.
58. United States Enviromental Protection Agency. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition October 2002. Environmental Protection. Washington; 2002.
59. Tóxicas S, Enfermedades R De. Hidrocarburos totales de petróleo (TPH) HIDROCARBUROS TOTALES. 1999.
60. EPA. Understanding Oil Spills In Freshwater Environments. Response to Oil Spills. 1999;7(3):37–44.
61. FONDEPES. Manual de Concha de Abanico. Ministerio de la Producción. 2018.
62. Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. Mar Biol. 1974;27(1):75–88.
63. EPA. SW-846 Test Method 8015C: Nonhalogenated organics by gas chromatography. Vol. SW-846, Hazardous Waste Test Methods/ SW- 846.

2007.

64. United States Enviromental Protection Agency. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms Fourth Edition October 2002. 2002.
65. J. A. Buege and S. D. Aust. Microsomal lipid peroxidation," Methods in Enzymology. J Phys Conf Ser [Internet]. 1975;71(0):302–9. Available from: http://stacks.iop.org/1742-6596/71/i=1/a=012004?key=crossref.9538450afe63dad1c84f8f585373a48b
66. G Lefèvre 1, Beljean-Leymarie, Beyerle M, Bonnefont-Rousselot, F C, Thérond DJPP, et al. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. Ann Biol Clin (Paris). 1998;56(3):305–19.
67. Marsden ID, Cranford PJ. Scallops and Marine Contaminants. In: Developments in Aquaculture and Fisheries Science [Internet]. Elsevier B.V.; 2016. p. 567–84. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62710-0.00013-4
68. MacKenzie L, Adamson J. Water column stratification and the spatial and temporal distribution of phytoplankton biomass in Tasman Bay, New Zealand: Implications for aquaculture. New Zeal J Mar Freshw Res. 2004;38(4):705–28.
69. Cummings KS, Graf DL. Mollusca: Bivalvia. In: Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates [Internet]. Third Edit. Elsevier Ltd; 2010. p. 309–84. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374855-3.00011-X
70. Hamza-Chaffai A. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. Int J Biotechnol Wellness Ind. 2014;3(1):19–26.
71. Sobrino-Figueroa AS, Cáceres-Martínez C, Botello A V., Nunez-Nogueira G. Effect of cadmium, chromium, lead and metal mixtures on survival and growth of juveniles of the scallop Argopecten ventricosus (Sowerby II, 1842). J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng. 2007;42(10):1443–7.
72. Romero-Murillo P, Espejo W, Barra R, Orrego R. Embryo–larvae and juvenile toxicity of Pb and Cd in Northern Chilean scallop Argopecten purpuratus.

Environ Monit Assess. 2018;190(1).

73. Rajkumar J.S.I. Marine Organisms in Toxicological Approach for the Assessment of Environmental Risk Associated With Cd, Cu, Pb and Zn. Univers J Environ Res Technol. 2012;2(2):1–7.
74. Hansen BH, Altin D, Øverjordet IB, Jager T, Nordtug T. Acute exposure of water soluble fractions of marine diesel on Arctic Calanus glacialis and boreal Calanus finmarchicus: Effects on survival and biomarker response. Sci Total Environ [Internet]. 2013;449:276–84. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.020
75. Lüchmann KH, Mattos JJ, Siebert MN, Granucci N, Dorrington TS, Bícego MC, et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster Crassostrea brasiliana following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. Aquat Toxicol. 2011;105(3–4):652–60.
76. Neff JM, Ostazeski S, Gardiner W, Stejskal I. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. Environ Toxicol Chem. 2000;19(7):1809–21.
77. González-Doncel M, González L, Fernández-Torija C, Navas JM, Tarazona JV. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (Oryzias latipes). Aquat Toxicol. 2008;87(4):280–8.
78. William G, Glenn R. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. Mar Ecol Prog Ser. 1997;147:149–57.
79. Hvilsom MM. Copper-induced differential mortality in the mussel Mytilus edulis. Mar Biol. 1983;76(3):291–5.
80. Famme P. Effect of shell valve closure by the mussel Mytilus edulis L. on the rate of oxygen consumption in declining oxygen tension. Comp Biochem Physiol -- Part A Physiol. 1980;67(1):167–70.
81. Loya Y. Possible effects of water pollution on the community structure of Red Sea corals. Mar Biol. 1975;29(2):177–85.
82. Dede E, Kaglo H. Aqua-toxicological Effects of Water Soluble Fractions (WSF) Of Diesel Fuel On O. Niloticus Fingerlings. J Appl Sci Environ Manag. 2010;5(1).
83. Müller JB, Melegari SP, Perreault F, Matias WG. Comparative assessment of

acute and chronic ecotoxicity of water soluble fractions of diesel and biodiesel on Daphnia magna and Aliivibrio fischeri. Chemosphere [Internet]. 2019;221:640–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.069

84. Raimondo S, Montague BJ, Barron MG. Determinants of variability in acute to chronic toxicity ratios for aquatic invertebrates and fish. Environ Toxicol Chem. 2007;26(9):2019–23.
85. Wang XH, Fan LY, Wang S, Wang Y, Yan LC, Zheng SS, et al. Relationship between acute and chronic toxicity for prevalent organic pollutants in Vibrio fischeri based upon chemical mode of action. J Hazard Mater [Internet]. 2017;338:458–65. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.058
86. Ahlers J, Riedhammer C, Vogliano M, Ebert RU, Kühne R, Schüürmann G. Acute to chronic ratios in aquatic toxicity - Variation across trophic levels and relationship with chemical structure. Environ Toxicol Chem. 2006;25(11):2937–45.
87. Sprague JB. Measurement of pollutant toxicity to fish—III. Water Res. 1971;5(6):245–66.
88. ANTOFAGASTA U DE. CONTAMINACION POR HIDROCARBUROS EN LA ZONA COSTERA DE LA CIUDAD DE ANTOFAGASTA. ANTOFAGASTA; 2005.
89. Fassiano, A.V, Ortiz, N., Rios de Molina MC. Estrés oxidativo en cefalópodos: I. Determinación de TBARS. Acta Toxicol Argentina. 2012;20(0):57–61.
90. Nogueira L, Garcia D, Trevisan R, Sanches ALM, da Silva Acosta D, Dafre AL, et al. Biochemical responses in mussels Perna perna exposed to diesel B5. Chemosphere. 2015;134:210–6.
91. Alves de Almeida E, Celso Dias Bainy A, Paula de Melo Loureiro A, Regina Martinez G, Miyamoto S, Onuki J, et al. Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. Comp Biochem Physiol. 2007;146(4):588–600.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Método 8015C de la EPA

METHOD 8015C

NONHALOGENATED ORGANICS BY GAS CHROMATOGRAPHY

SW-846 is not intended to be an analytical training manual. Therefore, method procedures are written based on the assumption that they will be performed by analysts who are formally trained in at least the basic principles of chemical analysis and in the use of the subject technology.

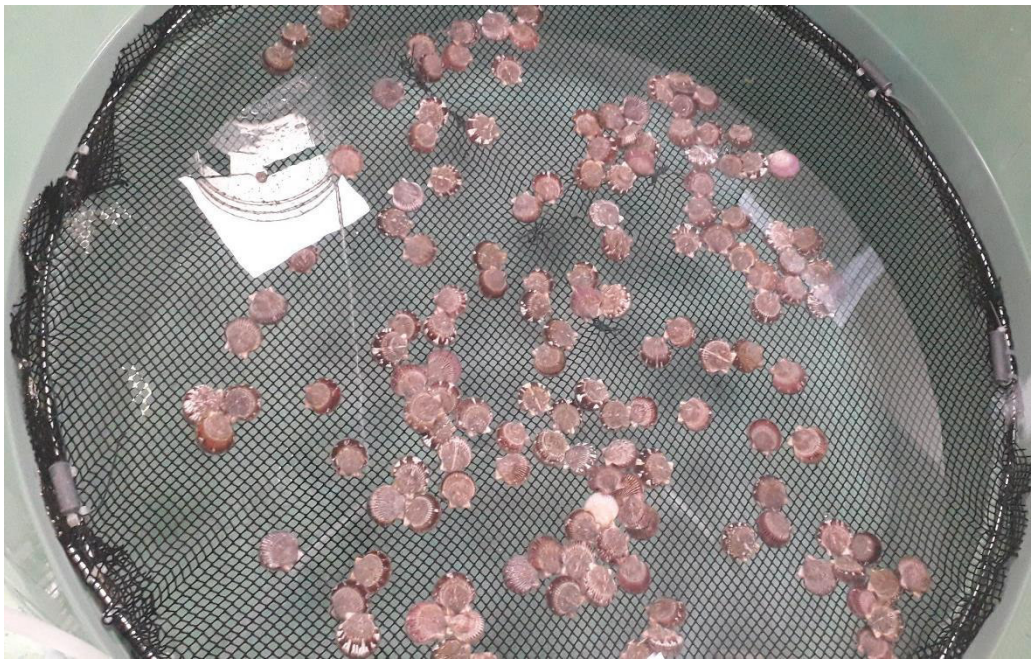
In addition, SW-846 methods, with the exception of required method use for the analysis of method-defined parameters, are intended to be guidance methods which contain general information on how to perform an analytical procedure or technique which a laboratory can use as a basic starting point for generating its own detailed Standard Operating Procedure (SOP), either for its own general use or for a specific project application. The performance data included in this method are for guidance purposes only, and are not intended to be and must not be used as absolute QC acceptance criteria for purposes of laboratory accreditation.

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 This method may be used to determine the concentrations of various nonhalogenated volatile organic compounds and semivolatile organic compounds by gas chromatography. The following RCRA compounds were quantitatively determined by this method, using the preparative techniques indicated.

Compound	CAS No.[a]	Appropriate Technique				
		Purge-and-Trap[b]	Head-space[e]	Direct Aqueous Injection	Azeo. Dist.[c]	Vacuum Dist.[d]
Acetone	67-64-1	pp / ht	x	x	x	x
Acetonitrile	75-05-8	pp	ne	x	x	ne
Acrolein	107-02-8	pp	ne	x	x	x
Acrylonitrile	107-13-1	pp	ne	x	x	x
Allyl alcohol	107-18-6	ht	ne	x	x	ne
t-Amyl alcohol (TAA)	75-85-4	ht	x	ne	ne	x
t-Amyl ethyl ether (TAEE)	919-94-8	x/ ht	x	ne	ne	x
t-Amyl methyl ether (TAME)	994-05-8	x/ ht	x	ne	ne	x
Benzene	71-43-2	x	x	ne	ne	x
t-Butyl alcohol (TBA)	75-65-0	ht	x	x	x	x
Crotonaldehyde	123-73-9	pp	ne	x	x	ne
Diethyl ether	60-29-7	x	ne	x	ne	ne
Diisopropyl ether (DIPE)	108-20-3	x/ ht	x	ne	ne	x
Ethanol	64-17-5	I	x	x	x	x
Ethyl acetate	141-78-6	I	x	x	x	ne
Ethyl benzene	100-41-4	x	x	ne	ne	x
Ethylene oxide	75-21-8	I	ne	x	x	ne
Ethyl *tert*-butyl ether (ETBE)	637-92-3	x/ ht	x	ne	ne	x
Isopropyl alcohol (2-Propanol)	67-63-0	pp	x	x	x	ne

Anexo 2. Aclimatación de los organismos en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática



Anexo 3. Preparación de soluciones de prueba



.



Anexo 4. Cuantificación de Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

La cantidad de hidrocarburos totales de petróleo en la muestra al 100% de fracción soluble de diésel en agua 1/4 w/v fue de 30,83

Fecha de Inicio:	26/2/2019
Fecha de Lectura:	27/2/2019
Fecha de Termino:	27/2/2019
Matriz:	Agua
Límite de cuantificación:	0.01 mg/L
Metodología:	EPA 8015C
GC-FID	ELAB - 152

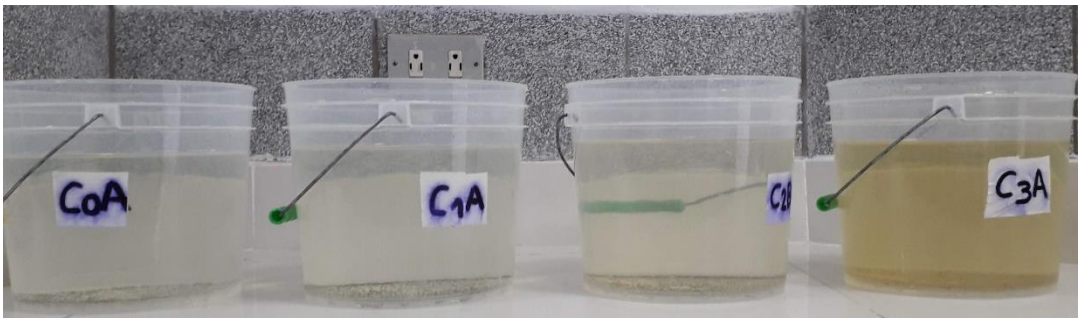
Surrogado:	50 ppm
MC:	(0.1 / 2.5 mg/L)
ADICIÓN:	(0.1 / 2.5 mg/L)
CCV:	500 mg/L (Curva)

ECUACIÓN		y = ax + b	
Curva		SURROGADO	C10-C28
Baja	a	20690.3003	19690.7456
	b	-15550.8741	164572.4559
Alta	a		18721.0480
	b		230197.5667

Código de muestra	Volumen de muestra (mL)	Volumen de Concentrado (mL)	Factor de dilución	Área surrogado	Conc. Surrogado (mg/L)	% RQ	Área total muestra	Área TPH	Concentración Curva (mg/L)	Concentración Final de TPH (mg/L)	% Rec / Promedio de duplicados	
CCVi			1.0				7978973	7978973	413.91		**82.78**	C10-C28
BK	1000	1.0	1.0	801777	39.50	79.01	1137515	335738	8.69	**<0.01**		C10-C28
LCS	1000	1.0	1.0	857461	42.19	84.39	2918192	2060731	96.30	**0.10**	**96.30**	C10-C28
M FSA 100% 1:4 (w/v)	**1000**	**5.0**	**1.0**	**955230**	**46.92**	**93.84**	**116600985**	**115645755**	**6165.02**	**30.83**		C10-C28

Nombre del Estandar	Marca	Lote	Fecha de Vencimiento
Hydrocarbon Window Defining Standard	AccuStandard	214101363	5/11/2024
Orto-Terfenil 99.9% (Surrogado)	Sigma Aldrich	MKBV3687V	
Estándar de Calibración: Diesel Fuel/SAE 30W Motor Oil	AccuStandard	216081176 / 215061421	15/08/2026 / 24/06/2025
Estándar de Control: Diesel Fuel/Shell Helix HX3 SAE50	ccuStandard/Grifo PRIMA	214091301	17/9/2024

Anexo 5. Vista frontal de las unidades de experimentación (filtración de alimento)



Anexo 6. Vista superior de las unidades de experimentación (cantidad de heces)



CO



C1

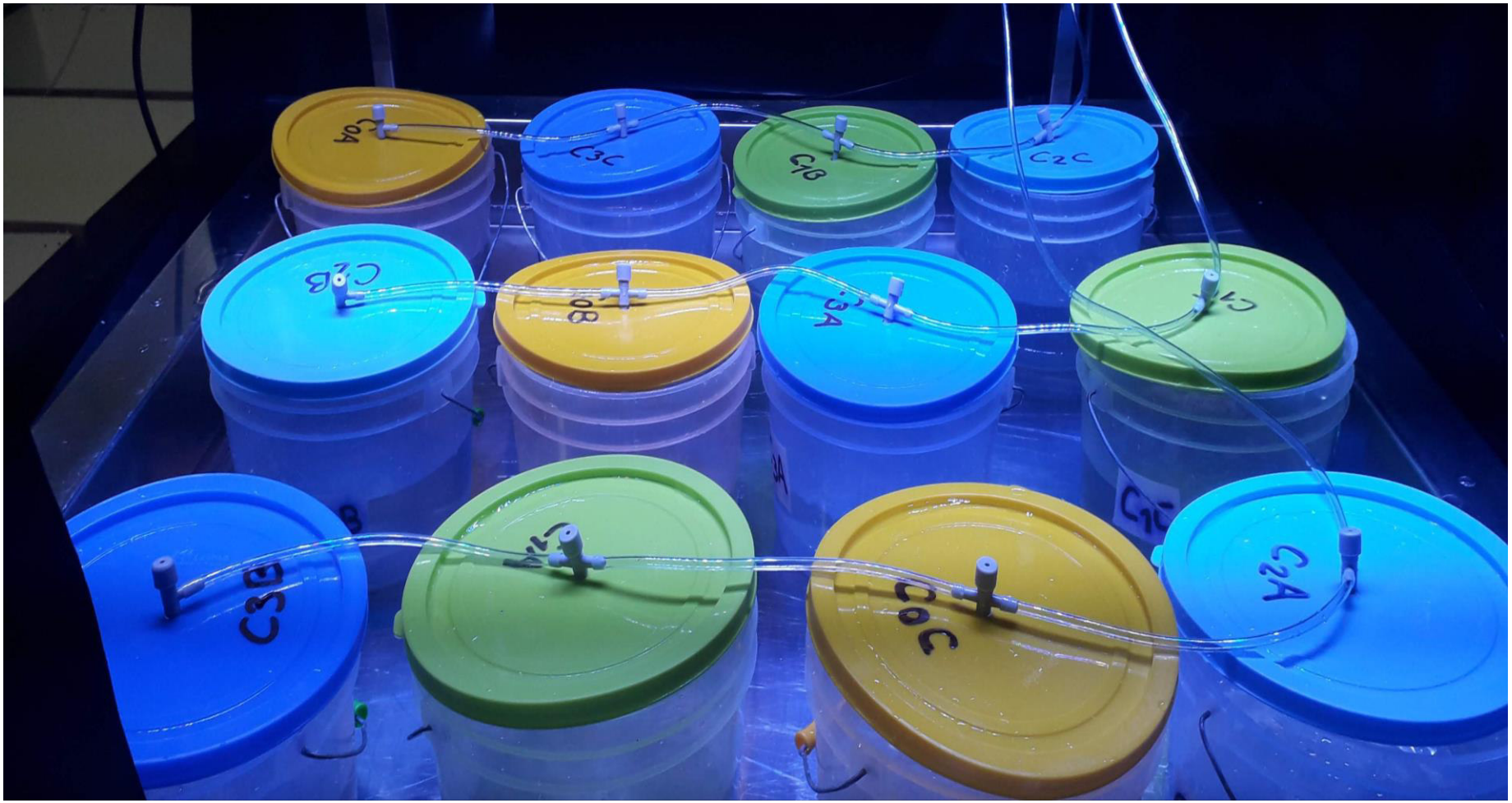


C2



C3

Anexo 7. Instalación de bioensayo crónico (aleatorización BCA)



Anexo 8. Parámetros fisicoquímicos de bioensayo crónico

	C0					C1					C2A					C3A				
	OD	pH	T°	Conduct	Salinidad	OD	pH	T°	Conduct	Salinidad	OD	pH	T°	Conduct	Salinidad	OD	pH	T°	Conduct	Salinidad
DIA 1	8,57	7,60	17,73	54,50	35,20	8,59	7,64	17,83	53,87	35,20	8,61	7,62	17,70	53,90	35,20	8,55	7,57	17,67	53,90	35,20
DIA 2	8,71	7,60	17,90	53,90	35,20	8,62	7,57	17,87	53,90	35,20	8,62	7,59	17,90	53,90	35,20	8,57	7,60	17,90	53,90	35,20
DIA 3	8,56	7,52	18,03	53,83	35,20	8,62	7,59	17,90	53,90	35,20	8,52	7,61	18,20	53,90	35,20	8,77	7,74	18,13	53,93	35,23
DIA 4	8,82	7,63	17,50	53,77	35,07	8,55	7,56	17,53	53,83	35,20	8,81	7,69	17,47	53,63	35,03	8,89	7,79	17,43	53,93	35,20
DIA 5	8,36	7,49	18,20	53,87	35,27	8,60	7,63	17,93	53,83	35,23	8,56	7,62	18,53	53,87	35,27	8,61	7,66	17,87	53,90	35,27
DIA 6	8,21	7,43	17,83	53,90	35,23	8,17	7,52	17,80	53,90	35,20	8,44	7,53	17,80	53,87	35,20	8,32	7,57	17,83	53,93	35,23
DIA 7																				
DIA 8	8,35	7,43	18,13	53,23	34,77	8,49	7,61	18,10	53,30	34,77	8,38	7,51	18,07	53,23	34,77	8,45	7,57	18,10	53,33	34,83
DIA 9	8,77	7,56	16,60	53,83	35,10	8,88	7,71	16,47	53,90	35,10	8,72	7,61	16,50	53,87	35,10	8,88	7,75	16,43	53,90	35,13
DIA 10	9,09	7,63	15,53	55,73	35,10	9,22	7,60	15,50	53,87	35,03	9,16	7,73	15,40	53,90	35,03	9,10	7,63	15,47	53,90	35,03
DIA 11	8,87	7,62	16,57	53,93	35,17	8,97	7,75	16,57	53,90	35,13	8,73	7,59	16,73	53,93	35,17	8,96	7,67	16,60	53,93	35,17
DIA 12	9,14	7,66	15,83	53,83	35,07	9,14	7,82	15,77	53,87	35,03	9,13	7,76	15,83	53,77	35,00	9,08	7,85	15,87	53,77	35,00
DIA 13	8,86	7,68	16,83	53,70	35,03	8,74	7,62	16,87	53,77	35,07	8,74	7,64	16,77	53,73	35,03	8,82	7,76	16,90	53,80	35,10
DIA 14																				
DIA 15	8,97	7,61	16,63	53,97	35,13	8,91	7,63	16,23	53,90	35,13	9,01	7,70	15,80	53,97	35,17	8,99	7,77	15,77	53,97	35,10
DIA 16	8,95	7,70	16,13	53,93	35,20	8,84	7,91	16,23	53,93	35,23	9,02	7,87	16,13	54,07	35,20	9,01	7,78	15,80	54,17	35,27
DIA 17	8,93	7,78	17,07	54,47	35,63	8,89	7,86	17,10	54,40	35,60	8,91	7,80	17,07	54,37	35,50	8,66	7,94	17,00	54,47	35,60
DIA 18	9,24	7,64	16,20	53,77	35,00	9,18	7,92	15,85	53,95	35,15	9,16	7,86	15,87	53,97	35,13	8,47	7,83	16,03	53,97	35,13
DIA 19	8,39	7,55	16,83	53,53	34,87	9,05	7,87	16,60	53,70	35,00	9,05	7,83	16,57	53,47	34,83	9,05	7,83	16,53	53,67	34,93
DIA 20	8,97	7,61	15,97	53,97	35,17	9,23	7,87	15,80	53,95	35,20	9,21	7,85	15,77	53,93	35,10	9,04	7,67	15,70	53,90	35,03
DIA 21																				
DIA 22	8,31	7,32	17,07	53,87	35,17	8,88	7,78	17,15	53,80	35,10	8,87	7,78	17,13	53,63	34,97	8,92	7,90	17,03	53,90	35,20
DIA 23	8,92	8,01	17,03	53,67	35,23	8,97	8,02	16,80	53,95	35,20	8,97	8,07	16,80	53,90	35,17	8,99	8,14	16,87	54,00	35,23
DIA 24	9,04	7,99	16,70	54,03	35,20	9,05	7,97	15,85	54,00	35,15	9,07	7,99	15,77	54,03	35,17	9,28	8,12	15,83	53,97	35,13
DIA 25	8,84	7,84	17,83	53,93	35,23	8,85	7,92	17,30	53,85	35,15	8,86	8,02	17,37	53,90	35,20	8,89	8,07	17,27	53,90	35,17
DIA 26	9,08	7,72	16,27	54,13	35,30	9,19	7,95	15,70	54,20	35,30	9,14	7,90	15,77	54,20	35,30	9,20	8,05	15,70	54,05	35,20
DIA 27	8,91	7,70	16,80	53,93	35,13	9,02	7,90	16,55	54,00	35,20	9,02	7,94	16,50	54,00	35,17	9,09	8,03	16,50	54,05	35,25
DIA 28																				