

DEDICATORIA

A mi Madre, a mi Tía, a mi prima y a mi Abue. Todas ellas mis madres, por su incondicional apoyo y amor.

Carlos Chávez.

AGRADECIMIENTO

Han colaborado muchas personas para que este trabajo esté culminado. Ruego se me disculpe si olvido mencionar a alguien, seguramente ya le habré agradecido en persona.

Agradezco a:

A Dios; por haber permitido que éste trabajo salga adelante a pesar de todas las dificultades que se presentaron.

A mi Madre por haberme otorgado tanto en esta vida y por estar a mi lado incondicionalmente día a día.

Al Dr. Luis Cumbal, por su apoyo incondicional en el proyecto y por compartir sus conocimientos para que las cosas fueran más claras, pero principalmente por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

A la Ing. Carolina Zurita, por su aporte en la codirección de este proyecto.

A la Comuna Jamanco, en especial a su Presidente el Sr. Juan González, por permitir la utilización de las instalaciones de la comuna para el cultivo de truchas.

A Doña Inés Yanacallo, su familia y amigos; por la ayuda que me brindaron con el mantenimiento del cultivo de truchas.

Al Laboratorio de Biología Celular del Centro de Biomedicina de la Universidad Central, especialmente a su director el Dr. Oswaldo Rodríguez; por haberme permitido utilizar sus instalaciones y su liofilizador para la preparación de las muestras.

Al Dr. Vicente Delgado; por haberme enseñado a utilizar el cromatógrafo de gases y por la ayuda en la estandarización de la técnica que se utilizó.

Al personal del CEINCI: Vladimir, Fabián y Érica; por su apoyo y por compartir sus conocimientos, muy útiles para el desarrollo del trabajo.

Al Ing. Juan Ortiz, por la venta de las truchas, por su asesoramiento en el cultivo y por su colaboración en todo lo que tenía que ver con truchas.

Al CIVABI de la Politécnica Salesiana, principalmente a Paco Noriega por su colaboración con los análisis en el espectrómetro de masas.

A mis compañeros tesisistas: Dolores, Anita, Marlene, Dany, Sandra, Anita, Gaby y Ricardo; por su apoyo, colaboración y compañía. Con ustedes a mi lado fue todo más sencillo.

A mi familia y amigos por su apoyo permanente.

Carlos Chávez.

NOMENCLATURA UTILIZADA

As: Arsénico.

AsB: Arsenobetaina.

MMA: Ácido monometilarsónico.

DMA: Ácido dimetilarsínico.

SAM: S-adenosilmetionina

GHS: Glutación.

TMA: Trimetilarsina.

TMAO: Óxido de trimetilarsina.

ATP: Adenosín trifosfato.

LD₅₀: Dosis letal media.

TCE: Tasa de crecimiento específico.

FCA: Factor de conversión alimenticia.

HG-AAS: Espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros.

GC-FID: Cromatografía de gases con detección de ionización en llama.

GC-MS: Cromatografía de gases con detección en espectrometría de masas.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1. Introducción.

El 8 de abril del 2003, una rotura del SOTE en la reserva Cayambe Coca, a la altura del sector denominado San Juan Loma, cuatro kilómetros aguas arriba de la laguna de Papallacta; generó un derrame de crudo que fluyó a través del río Sucus, que desembocó en el río Tambo hasta alcanzar las aguas de la laguna de Papallacta. Se habrían derramado entre 6000 y 13000 barriles (Heredia & Bernal, 2003). En todo el recorrido del derrame, se comprobó la fuerte contaminación de las aguas, de la vegetación, de las rocas y del suelo.

El derrame, ocurrido el 8 de abril del 2003, ha tenido un fuerte impacto en proyectos comunales de piscicultura, ganadería y ecoturismo. La comuna de Jamanco había pagado los rubros necesarios al Consejo Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), para la concesión de las aguas del río Tambo, con el fin de desarrollar proyectos de piscicultura. Según Acción Ecológica el derrame provocó que se perdieran 4 toneladas de trucha, una inversión de 7500 USD y una posible ganancia de 12000 USD (Weemaels, 2003).

A partir de los análisis realizados en los trabajos de la remediación del derrame, se evidencia niveles altos de Arsénico en las aguas de la laguna, presentando una concentración entre 109 y 650 $\mu\text{g} / \text{L}$. (Heredia & Bernal, 2003), y en trabajos más

recientes se encontraron concentraciones entre 220 $\mu\text{g/L}$ y 369 $\mu\text{g/L}$ en época de verano y entre 85 $\mu\text{g/L}$ y 130 $\mu\text{g/L}$ en época de invierno (Cumbal et al., 2006).

Por otra parte en aguas del río Tambo, afluente principal de la laguna de Papallacta, se han reportado concentraciones de arsénico entre 62 $\mu\text{g/L}$ y 698 $\mu\text{g/L}$, dado que existen fuentes de aguas termales en la cuenca alta del río con concentraciones de arsénico entre 1090 $\mu\text{g/L}$ y 7853 $\mu\text{g/L}$. Adicionalmente, en la parte baja del río Tambo a la altura de la toma de agua de las piscinas de producción piscícola de la Comuna Jamanco, se han reportado concentraciones de aproximadas de 150 $\mu\text{g/L}$ (Cumbal et al., 2006) ya que existen muy cerca de este punto dos fuentes de agua termal que se descargan al río.

La zona de la laguna de Papallacta ha sido por mucho tiempo uno de los lugares predilectos en el Ecuador para realizar cultivos de truchas. En la zona existen varios lugares que ofrecen actividades como la pesca deportiva y la preparación de platos que tienen como materia prima principal la trucha cultivada en las aguas de la laguna de Papallacta.

Los informes de impacto ambiental del derrame ocurrido el 8 de abril del 2003, realizados por organizaciones ecológicas nacionales, manifiestan que su principal preocupación es que la contaminación causada por el derrame persista por mucho tiempo debido a que los trabajos de contingencia y de limpieza han sido deficientes y tardíos. Estos mismos informes recomiendan que las actividades de piscicultura se suspendan en la laguna y en los lugares que utilicen aguas de sus afluentes y efluentes, debido a que estas contienen contaminantes de alto riesgo para la salud humana, entre los cuales se encuentra el Arsénico (Weemaels, 2003).

Debido a todas estas recomendaciones, la actividad del cultivo de truchas se ha visto paralizada en la zona de la laguna. Se han dejado a un lado proyectos de gran producción piscícola, generando importantes pérdidas económicas a los inversionistas de estos proyectos. Las pérdidas no solo se han presentado en los cultivos piscícolas, sino también en el sector turístico ya que se ha creado, una fobia hacia las actividades que se realizaban en la zona antes de que el derrame ocurra.

Mucha de la información que se ha divulgado en la prensa se fundamenta en informes presentados por organizaciones ecologistas. Sin embargo estos informes se limitan dar datos poco específicos y demasiado generales, en los cuales la mayor parte de los mismos está dedicada a criticar los planes de contingencia y la ruta del SOTE, que a evaluar las consecuencias del derrame. El contenido de estos informes ha sido altamente difundido y ha sido tomado como fuente de información para divulgación general.

Aunque han transcurrido varios años de ocurrido el derrame, por parte de la población, se mantiene el temor a cultivar trucha en la zona, ya que la aversión desarrollada por los visitantes, ha reducido el mercado y se cree que las pérdidas económicas serán significativas.

Por ejemplo, se teme que los niveles de arsénico presentes en las agua del río Tambo y de la laguna causen bioacumulación en las truchas y por lo tanto intoxicación en los consumidores de éstas. Sin embargo estos temores no se encuentran respaldados con estudios científicos.

Las investigaciones en otros países han demostrado que el arsénico es transformado dentro del organismo de algunos peces, entre los cuales está la trucha, a una forma molecular orgánica, llamada arsenobetaina, que es eliminada fácilmente por el organismo humano, sin producir bioacumulación ni efectos tóxicos en el mismo (Foa, V. et al., 1987). Además, se ha reportado en varios trabajos científicos que la arsenobetaina es la especie predominante dentro de organismos de peces, aportando entre 70 a 90 % de arsénico con respecto al arsénico total en la muestra del animal (Suñer, 2001; Torralba, 1996; Abernathy, 2001).

El estudio de la contaminación con Arsénico de es de gran interés para la comunidad científica, debido a sus propiedades tóxicas. Es conocido que la toxicidad del Arsénico depende no solo de la concentración total del elemento químico, sino también de las especies químicas que este elemento presenta. Las formas inorgánicas son las más tóxicas, seguidas por las formas metiladas y los compuestos orgánicos arsenicales en último lugar, considerándose a la Arsenobetaina y a la Arsenocolina como especies no tóxicas (Pizarro, 2003).

En el Ecuador no existe ninguna normativa que regule la concentración máxima admitida de Arsénico en peces ni productos de pesca para el consumo humano. En el mundo solo los países de Noruega y Finlandia poseen una normativa que regula el límite de Arsénico en peces y productos del mar, el límite es de 2 mg/Kg de arsénico inorgánico en el producto. La Unión Europea está trabajando en un proyecto para estandarizar el límite máximo de arsénico inorgánico en peces en 2 mg/Kg, en todos los países que la conforman. Por otra parte Estados Unidos tiene como límite máximo de arsénico en alimentos, 6 ppm.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la cantidad de arsénico total y arsenobetaina en truchas cultivadas en piscinas alimentadas con aguas del río Tambo, principal tributario de la laguna de Papallacta.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una determinación de la calidad del agua del río Tambo que se utilizará para los cultivos de truchas, mediante análisis cuantitativos y cualitativos de parámetros generales y específicos como la concentración de Arsénico.
- Implantar un cultivo de truchas de alrededor de los 90 gr de peso y en etapa de crecimiento; bajo condiciones homogéneas utilizando agua del río Tambo, utilizando los peces como biomonitores durante dos meses.
- Determinar cuantitativamente por Espectrofotometría de Absorción Atómica el Arsénico total en los músculos de las truchas cultivadas.
- Desarrollar un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de arsenobetaina y aplicarlo para la determinación de este compuesto por cromatografía de gases con detección de ionización en llama, en muestras de músculo de pez.
- Desarrollar un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de arsenobetaina y aplicarlo para la determinación de este compuesto por cromatografía de gases con detección en espectrómetro de masas, en muestras de músculo de pez.
- Determinar el porcentaje de arsénico orgánico, en forma de arsenobetaina en relación a las concentraciones de arsénico total determinado en los músculos de las truchas cultivadas.

- Proponer recomendaciones acerca del cultivo de truchas en aguas contaminadas con arsénico y acerca del consumo humano de truchas cultivadas en aguas del río Tambo.

1.3. Marco Teórico.

1.3.1. Trucha Arco Iris.

Nombre científico: *Oncorhynchus mykiss*, antes denominada *Salmo gairdneri*.

Nombre vulgar: Trucha arco iris.

De orden Salmoniformes, suborden Salmonoidei, familia Salmonidae, subfamilia Salmonidae (Blanco, 1994). Es una especie introducida en el Ecuador y es originaria del Pacífico Norteamericano.

Especie de talla media que en libertad no suele sobrepasar los 60 cm de longitud. Es la trucha de producción industrial por excelencia. Semejante a la trucha común, pero con la cabeza más pequeña, y con las aletas adiposa y caudal moteadas con manchas negras. Además, presenta una banda irisada que le recorre todo el cuerpo.

Su cuerpo es alargado y un tanto comprimido. Se caracteriza por poseer unas escamas bastante pequeñas y de colores tornasoles, aunque su coloración varía dependiendo del hábitat donde se encuentre y de su alimentación. Poseen una aleta adiposa por detrás de la dorsal. Aletas Dorsal y anal de base corta. Aleta caudal recta o ligeramente cóncava. Boca grande con dientes cónicos en las quijadas y paladar. La cantidad de mucosidad es un tanto exagerada con respecto a la que poseen otros peces y esta a su vez, le ayuda a nadar fácilmente en los torrentes, donde acostumbra pasar la mayoría del tiempo.

Vive en ríos de montaña con agua fría, aunque es menos exigente que la trucha común en lo referente a la temperatura y oxígeno. Posee un crecimiento rápido y su vida media es de cuatro a cinco años. Se reproduce entre enero y marzo. Su alimentación se basa en larvas de invertebrados, aunque también puede comer otros peces de pequeño tamaño (Blanco, 1994).

Es autóctona de ríos afluentes del río Sacramento, en Norteamérica. Su área natural son las aguas vertientes al Pacífico desde el sur de Alaska hasta California.

1.3.2. Cultivo de Trucha Arco Iris.

La trucha arco iris es la especie predilecta para producciones piscícolas. Esta especie tiene hoy en día una gran importancia en el mundo industrial de piscicultura, está altamente diseminada y es objeto de cría intensiva en todos continentes. Esta situación es el resultado de una respuesta positiva de la especie, a los condicionamientos impuestos por el hombre durante los últimos 100 años (Blanco, 1994). Para el cultivo de Trucha Arco Iris hay que tomar en cuenta diferentes aspectos cómo: Calidad del agua, instalaciones de la granja, alimentación.

1.3.2.1. Calidad del agua.

La calidad de agua a utilizarse en el cultivo de truchas está dada por el conjunto de sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Las propiedades físicas como temperatura, pH, oxígeno, turbidez, etc., pueden estar sometidas a variaciones bruscas por le influencia de factores externos, fundamentalmente cambios atmosféricos y climáticos. Las propiedades químicas, sin embargo, son mucho más estables y sus variaciones son mínimas, salvo en casos excepcionales en los que una contaminación puede producir efectos irreversibles. Las propiedades biológicas están condicionadas a la ausencia o presencia de agentes patógenos (Blanco, 1994).

Tabla 1.1. Valores normales, dudoso y peligroso de los factores físicos – químicos para los salmónidos.(Blanco, 1994)

Factores	Unidad de medida	Salmónidos		
		Normal	Dudoso	Peligroso
Temperatura del agua	°C	Menor de 20	20-22	22 y más
Oxígeno disuelto	mg/L	Mayor a 7,5	5 – 7,5	Menor de 5
pH	pH	6<pH<9	pH<6 pH>9,2	pH<5,5 pH>9,5
Condutividad a 20°C	µS/cm	20 – 500	500 – 600	>600
Alcalinidad en (HCO ₃) ⁻ o bicarbonatos	mg/L	Débil 8 – 60 Fuerte 400		

Calcio	mg/L	Fuerte 60 – 200		
Sulfatos	mg/L	0 – 50	50 – 100	+ de 100
Ácido Sulfhídrico	- o +	-	+	++
Nitratos	mg/L	Débil 0 – 10 Fuerte 11 o más		
Nitritos	mg/L	0 – indicios 0,001	0,1	Igual o más de 1
Amoniaco	mg/L	0 – indicios 0,001	0,1	Igual o más de 1
Cloruros	mg/L	Indicios – 20	20 – 50	Más de 50
Materias en suspensión	mg/L	Menos de 30	30 -70	Más de 70
Anhídrido carbónico	mg/L	Menos de 20	12 – 20	Más de 20
Oxidabilidad en frío en 4 h.	mg/L	1 - 2	2 – 5	Más de 5

La Tabla 1.1. muestra los valores de los parámetros físicos – químicos a ser tomados en cuenta para el cultivo de salmónidos (Blanco, 1994). En el caso de la trucha arco iris estos parámetros son aplicables. Sin embargo, los parámetros de mayor cuidado durante el cultivo son la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH; ya que el conjunto de estos determina el ambiente favorable para asegurar la vida y el correcto crecimiento de los animales (Blanco, 1994; Alvarado & Bastardo, 1983). La variación de cualquiera de estos parámetros afecta directamente sobre la fisiología de los animales produciendo cambios en sus funciones más vitales como son la respiración, la alimentación y la reproducción (Blanco, 1994).

Respecto a la concentración de arsénico permisible en las aguas con que se cultivan las truchas, en el Ecuador, el nivel máximo permitido para realizar actividades de acuicultura es 0,05 mg/L., según los “Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario”, descritos en el Texto Unificado de Legislación Ambiental, libro VI, anexo I (2002).

1.3.2.2. Instalaciones de una granja truchícola.

El diseño de una granja depende muchos factores como el tamaño de producción, la disponibilidad de agua, la ubicación geográfica, la calidad de agua, entre otras. Sin embargo existen varias instalaciones comunes en las diferentes granjas que ya han sido implantadas (Alvarado, H. & Bastardo, H., 1983). Es substancial comprender las diversas clases de cada una de estas instalaciones al igual que su importancia dentro de la granja y funcionamiento. Entre las principales estructuras de que debe poseer una granja de producción truchícola están las siguientes.

a. Presa o dique de toma de agua.

Permite la regulación del paso permanente de un caudal de agua hacia los sistemas de riego, instalaciones acuícolas, etc.. La más común es la vertical, constituida por tablillas correderas. También existe la toma de agua con rejilla horizontal, la cual presenta la ventaja de mantener el agua más limpia que la vertical. Una rejilla de 1 m² permite el paso de 1 m³ de agua por minuto (Alvarado, H. & Bastardo, H., 1983)

b. Canal general de conducción de agua.

Mediante este canal el agua llega desde la toma hasta la truchifactoría. Debe estar sólidamente construido a fin de evitar inconvenientes. Debe tener una inclinación suave entre 5° y 10 °, para permitir la fácil circulación de los volúmenes de agua requeridos por la truchifactoría. Suele colocarse obstáculos o escalonarse el canal, para que el agua llegue más oxigenada al estanque de distribución (Alvarado, H. & Bastardo, H., 1983).

c. Estanque de decantación y distribución del agua.

Es conveniente que el agua destinada a la granja, pase primero por un estanque de decantación y distribución. En el fondo del decantador, quedan depositados la arena y el lodo que de otra forma entorpecerían el normal desarrollo del cultivo. La distribución del agua a los estanques se puede hacer por tubería o por canales. Los tubos tienen la ventaja de controlar los caudales de agua mediante válvulas o grifos, y la desventaja de sufrir obstrucciones de difícil reparación. Por otro lado, los canales

facilitan un mayor control del agua que circula por ellos y cualquier obstáculo es más evidente. En ellos el agua se controla por compuertas (Alvarado & Bastardo, 1983).

d. Estanques de alevinaje.

En estos estanques se crían los alevines. Deben estar parcialmente a la intemperie, para acostumar los animales a la luz solar. Su construcción puede ser en concreto, fibra de vidrio o cualquier otro material de superficie lisa para evitar su rápido deterioro, debido a la circulación del agua. Su forma puede ser rectangular o circular. Las dimensiones recomendadas en estanques rectangulares son de 5 a 7 m. de longitud por 0,60 a 1 m. de ancho y 0,40 a 0,60 m. de altura. Los estanques circulares tienen la ventaja que su masa acuosa está en continuo movimiento, impide la formación de zonas muertas carentes de recambias y ofrece mayor limpieza por recogerse en el centro todas las deyecciones y residuos alimenticios. Permite duplicar y hasta triplicar la densidad de población de peces, en relación con la adoptada normalmente para los estanques rectangulares (Alvarado, H. & Bastardo, H., 1983).

e. Estanques para cría, engorde y reproductores .

Estanques circulares:

Este tipo de estanque es normalmente construido de cemento, el diámetro varía de 3,5 a 7 metros; el fondo no es plano sino inclinado, con pendiente de 3 a 4% y una profundidad de 0,80 a 1 metro.

Estanques rectangulares:

Pueden construirse por simples excavaciones en tierra, o hacerse de concreto armado, ladrillos, etc. Su correcto diseño permite un gran aprovechamiento de la corriente de agua y disminuye la formación de zonas muertas. Defectos en su diseño incrementa los remolinos de agua y zonas muertas por lo que el esfuerzo de los animales aumenta produciendo un mayor consumo de oxígeno (Blanco, 1994).

Estanques de tierra o de fondo natural:

Su ancho excede los 5 metros, de forma que el alimento se distribuye regularmente. La longitud varía entre 10 y 30 metros y la profundidad entre 0,75 y 1 metro.

Este tipo de estanque tiene la ventaja de ofrecer a las truchas un ambiente más parecido a su hábitat natural. Respecto a los construidos en cemento, presenta las siguientes desventajas: mayor mano de obra para mantenerlos limpios, necesidad de mayor superficie útil, mayor dificultad para control y prevención de enfermedades infecciosas, mayores pérdidas de alimento.

Estanques de hormigón o concreto armado:

Este tipo de estanque precisa de una mayor inversión. La longitud varía entre 10 a 50 m., la profundidad 1 a 1,20m. y la anchura 3 a 6m (Alvarado, H. & Bastardo, H., 1983).

f. Canales o tuberías particulares de suministro de agua a cada grupo de estanques

Las tuberías o canales que van a alimentar a cada grupo de estanques debe partir del embalse de decantación o distribución del agua. Si son tuberías deben estar provistas de llaves o válvulas dobles y si son canales deben poseer compuertas verticales graduadas. Para que el agua circule con facilidad se requiere una pendiente mínima de 4% (Alvarado & Bastardo, 1983).

g. Canales de desagüe

Los canales de desagüe están ubicados en el lado opuesto a la entrada del agua. La pendiente mínima indicada es del 6% para facilitar la salida de los residuos y el rápido vaciado del estanque cuando sea necesario. El agua procedente de estos desagües irá a dar a la parte más baja del terreno, donde se forma una especie de depósito y de aquí pasa a la fuente de agua (Alvarado & Bastardo, 1983).

h. Dependencias anexas

En toda truchifactoría es necesaria la construcción de instalaciones anexas, como son los depósitos para alimentos y maquinarias, vivienda del encargado, oficina, sala de faena y todas aquellas instalaciones que permiten el buen funcionamiento de una producción de este tipo (Alvarado & Bastardo, 1983).

1.3.2.3. Alimentación y crecimiento.

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se cultivada en la región andina del Ecuador, puede alcanzar hasta 7 kg de peso. Para su producción comercial se utiliza el sistema intensivo de cultivo en unidades de producción de reducida superficie donde se mantienen elevadas concentraciones de ejemplares. El ritmo de crecimiento de las truchas depende de factores ambientales (temperatura, cantidad y calidad del agua, suelos, etc.); características genéticas (líneas de crecimiento rápido, rusticidad y resistencia a enfermedades, aptitud para altas densidades de confinamiento); y de las técnicas de manejo del cultivo (Alimentación, estabulación, densidades, etc.) (Blanco, 2004).

El crecimiento de la trucha está comprendido desde el momento de la eclosión del huevo hasta alcanzar los tamaños comerciales previstos: “pan size”, con pesos entre 200 y 300 gramos con una talla de 20 a 30 cm de longitud, características alcanzadas en un tiempo entre 12 y 16 meses de cultivo; y el tamaño de “engorde grande”: con pesos entre 400 y 2,000 gramos, que se alcanza entre los 26 y 32 meses de cultivo. En la práctica es necesario realizar clasificaciones periódicas con énfasis en los periodos de cría inicial hasta los 50 g (Blanco, 1994).

Por otra parte, según Blanco (1994), la mortalidad esperada durante un cultivo depende de la etapa de crecimiento de los animales. Es así que en el periodo de incubación de ovas, se presenta una mortalidad entre 8 % y 15 %; cuando el animal se encuentra entre 0,35 y 2 g, la mortalidad reportada es de menos del 5%; en pesos entre 2 y 5 g, la mortalidad es del 3% y la mortalidad total acumuladaTotal hasta la cosecha: 30 a 45%

1.3.3. Arsénico.

1.3.3.1. Generalidades sobre el Arsénico.

El Arsénico es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre. Es el elemento veintavo más abundante en el globo terráqueo. El Arsénico es un metaloide de aspecto gris plateado, de símbolo As, número atómico 33, peso atómico 74,92 gr/mol (Foa et al, 1987) .

Su abundancia en la corteza terrestre es muy variada y especialmente elevada en zonas con fuentes hidrotermales, rocas volcánicas, compuesto sulfurados, carbón, etc.. Los minerales de arsénico más importantes son: arsenopirita (FeAsS), lollingita (FeAs₂), cobaltito (CoAsS), domeikita (Cu₃As), niquelito (NiAs), escuterudita (CoNiFe)As₃, regalar (As₄S₄), oropimente (As₂S₃) y allemontita (AsSb), todos ellos de origen hidrotermal que se forman a partir de altas temperaturas, relacionadas a las últimas fases de la consolidación magmática (Torralba, 1996).

En el medio ambiente, el Arsénico se encuentra combinado con otros elementos como por ejemplo oxígeno, cloro y azufre. El Arsénico combinado con estos elementos se conoce como Arsénico inorgánico. El Arsénico combinado con carbono e hidrógeno se conoce como Arsénico orgánico (Irwin et al., 1997).

La principal fuente de arsénico en la ingesta humana, además del agua de bebida, son los peces, productos de la pesca y productos del mar, siendo la concentración de arsénico total en estos productos entre 0,77 a 4890 µg/kg (WHO, 2001).

La mayoría de los compuestos inorgánicos y orgánicos de Arsénico son polvos de color blanco que no se evaporan. No tienen olor y la mayoría no tiene ningún sabor especial. Por esta razón, generalmente no se puede saber si están presentes en los alimentos, el agua o el aire (Foa et al., 1987).

Las principales rutas de exposición de las personas al Arsénico son la ingesta e inhalación. El Arsénico es acumulable en el organismo por exposición crónica y superados ciertos niveles de concentración, puede ocasionar afecciones como alteraciones de la piel (relajamiento de los capilares cutáneos y la dilatación de los mismos), lesiones dérmicas (neoplasias de piel), vasculopatías periféricas ("enfermedad

del pie negro"), además de enfermedades respiratorias; neurológicas (neuropatías periféricas), cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (pulmón, riñón, hígado, vejiga y de piel) (Foa et al., 1987).

1.3.3.2. Arsénico en peces.

Los peces son la parte más alta de la cadena trófica en ambientes acuáticos. La producción primaria de fitoplancton y microalga pueden acumular arsénico y transformar formas inorgánicas en moléculas orgánicas complejas que pueden ser hidrosolubles o liposolubles. Peces e invertebrados marinos retienen el 99% del arsénico en compuestos orgánicos. La concentración de arsénico inorgánico rara vez excede 1 mg/kg en sus tejidos (Tamaki & Frankenberger, 1992).

La arsenobetaina fue aislada y purificada de la langosta de la roca australiana *Panulirus longipes* por Edmons (1977) y en el tiburón gris *Carcharhinus obscurus* por Kurusawa (1980). Luten et al. (1983) ha determinado que en camarones, flounder, lenguado, sole y lemon sole, la especie arsenical predominante es la arsenobetaina. Las concentraciones encontradas de arsénico van en rango desde 0,45 a 31,4 µg/g.

La generación de arsenobetaina desde arsenozúcares ingeridos en algas requiere de la clibaje en la unión C3-C4 del residuo del azúcar y la subsiguiente oxidación del carbono C4. Además la reducción y metilación del arsénico puede producir un compuesto cuaternario (tetraalquilado) de arsenobetaina (Edmons & Francesconi, 1987). Dimetilarsinoyetanol (Figura 1.1.), un producto de descomposición aeróbica bacteriana de arsenozúcares, ha sido propuesto como un producto intermedio en la formación de arsenobetaina (Tamaki & Frankenberger, 1992). Sin embargo el proceso en que el dimetilarsinoyetanol es transformado a arsenobetaina no es claro. La ruta metabólica de formación de arsenobetaina en peces aun no está completamente definida.

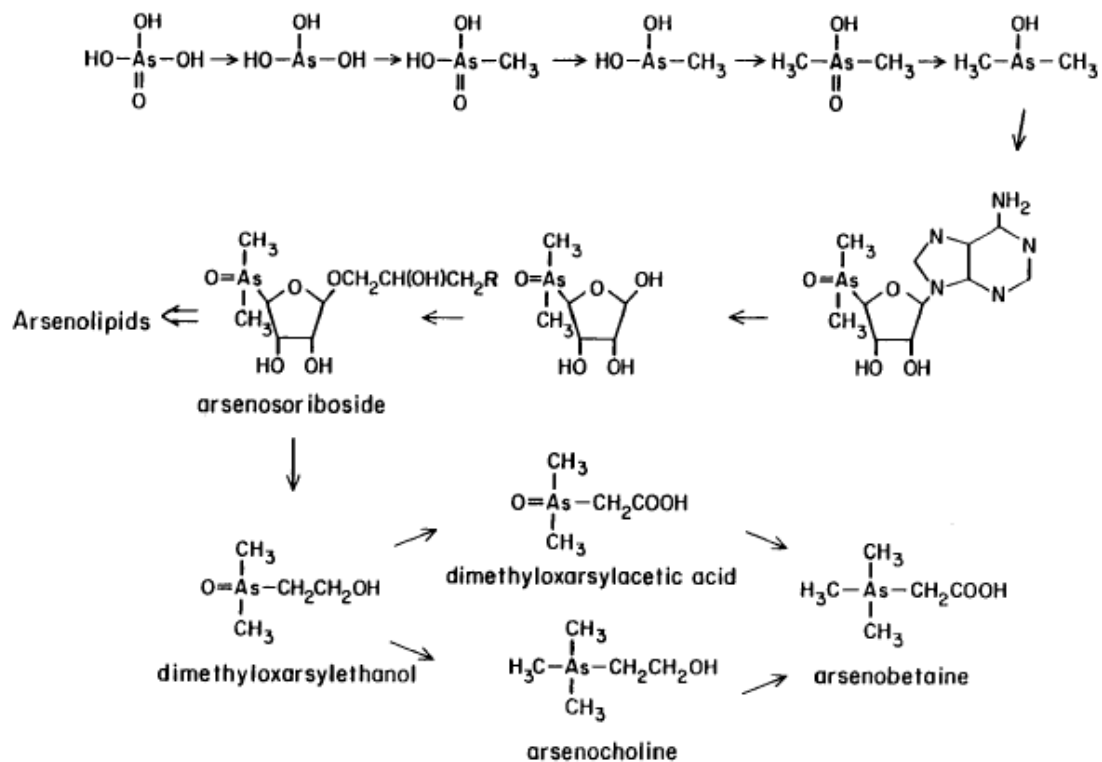


Figura 1.1. Ruta metabólica de formación de arsenobetaina en algas marinas. (Tamaki, S. & Frankenberger, W.T., 1992)

1.3.3.3. Metabolismo del Arsénico.

El arsénico no es conocido como un requerimiento nutricional para los organismos vivos. Los procesos metabólicos de este metaloide han sido estudiados en diferentes especies biológicas, incluidos los humanos. El metabolismo del arsénico como de otros metales tóxicos es asociado con la conversión de formas mayormente tóxicas a formas moleculares menos tóxicas, seguidas por la acumulación y excreción fuera de las células. Estudios con el mercurio presentan a este elemento biomagnificado a través de la cadena alimenticia, sin embargo con el arsénico no ocurre lo mismo (Roy & Anupama, 2002).

El metabolismo del arsénico es caracterizado en muchas especies por dos principales tipos de reacción: (1) la reducción de especies pentavalentes a trivalentes, y (2) reacciones de metilación oxidativa donde las formas trivalentes son secuencialmente metiladas (WHO, 2001). La biometilación del arsénico es considerada el mecanismo primario de detoxificación de los organismos vivos. Se ha encontrado que un gran

número de especies de levaduras, hongos, algas, plantas y animales, transforman los compuestos arsenicales inorgánicos a compuestos metilados. Las especies arsenicales orgánicas que generalmente derivan de los procesos de metilación del arsénico son: arsenoazúcares, arsenobetaina, arsenocolina y arsenolípidos. Estas especies son encontradas con mayor frecuencia en organismos acuáticos, incluyendo crustáceos, langostas, peces y en muchas otras especies de animales marinos (Roy & Anupama, 2002).

En organismos superiores, el arsénico inorgánico es metilado a ácido monometilarsónico (MMA) y finalmente a ácido dimetilarsínico (DMA) gracias a la participación del donador del grupo metil, S-adenosilmetionina (SAM), catalizado por las enzimas metiltransferasas en presencia del cofactor glutatión (GHS) (Figura 1.1.) (Roy & Anupama, 2002).

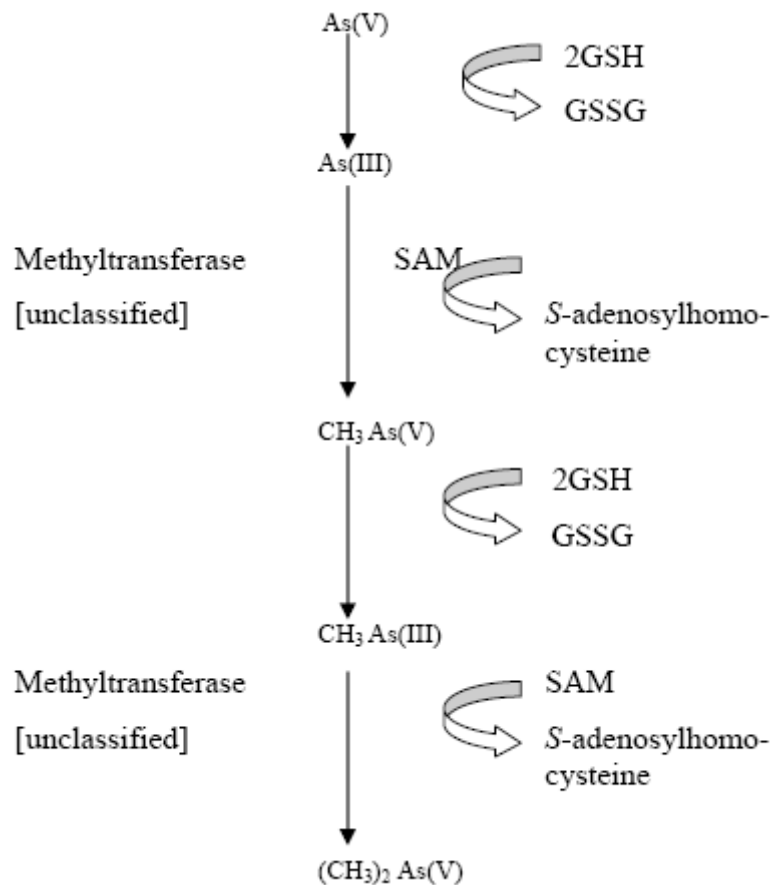


Figura 1.2. Metilación de arsénico en mamíferos. (WHO, 2001).

Vahter y Marafante (1985), en estudios realizados con animales determinaron que la reducción de especies pentavalentes a especies trivalentes es un proceso no enzimático que ocurre en condiciones de concentraciones bajas en oxígeno (encontradas en el tracto digestivo) o en condiciones de pH 2 o menor (WHO, 2001).

Estos derivados de la metilación son cientos de veces menos potentes como agentes mutagénicos que los compuesto arsenicales inorgánicos, como se ha hecho evidente en ensayos de linfoma en ratones (Roy & Anupama, 2002).

La actividad de metilación es localizada en el citosol y parece que ocurre secuencial y principalmente en el hígado de mamíferos. Styblo et al. (1996), usando un sistema de citosol de hígado de rata, encontró que si el material de inicio era arsenato o arsenito, el MMA era detectado más rápidamente que DMA. Resultados similares han sido obtenidos usando cortes de hígado de ratas por Buchet y Lauwerys. Utilizando tejidos de rata se ha demostrado que el hígado y el riñón tienen la capacidad de metilar arsenito, pero la actividad del hígado fue claramente mayor (WHO, 2001).

Estudios en humanos han arrojado resultados similares a los encontrados en animales. Una diferencia importante es que la excreción de MMA en humanos es mayor que en animales. La base biológica para esta diferencia es aun desconocida, pero se atribuye a las amplias diferencias interespecies que han observado en estudios con otros mamíferos (WHO, 2001).

Con respecto a compuestos orgánicos del arsénico cómo MMA, DMA, trimetilarsina (TMA), oxido de trimetilarsina (TMAO), arsenobetaina y arsenocolina; se conoce que son menos metabolizado en el organismo que los compuestos inorgánicos y más rápidamente eliminados (WHO, 2001).

En base a datos de estudios de ingestión controlada se encontró que MMA y DMA son metabolizados de una manera similar en humanos y animales. Buchet et al. (1981) reportó que después de una dosis simple de MMA (500 $\mu\text{g As}$). El 87,4% del total de metabolitos fueron excretados a través de la orina en 4 días en forma de MMA y un 12,6% fue en forma de DMA. En este mismo estudio se reportó que una simple dosis de DMA (500 $\mu\text{g As}$) fue excretada en su totalidad en forma de DMA. Sin embargo

Marfante et al. (1987), reportó haber encontrado 3,5% TMAO en la excreción de 2 días después de haber ingerido una dosis simple de DMA (0,1 mg As/kg) (WHO, 2001).

Estudios en que a ratas, ratones, conejos y hamsters se les administró arsenobetaina por vía intravenosa o por vía oral, indicaron que esta no es biotransformada o demetilada (Vahter et al., 1983; Yamauchi et al., 1986). Arsenocolina tampoco es demetilada, pero es transformada a arsenobetaina. Marafante et al. (1984) reportó que en ratones, conejos y ratas fue administrada una dosis de 4 mg As/kg de arsenocolina por vía intravenosa, y aproximadamente del 40 al 60% de la dosis fue eliminada en la orina en dos días, como arsenobetaina. Al igual que en los animales, en humanos la arsenobetaina ingerida en productos de pesca, es eliminada en la excreción urinaria lo que indica que no es metabolizada (WHO, 2001).

Varios estudios de Vahter et al. (1983), han demostrado que la arsenobetaina es rápidamente y predominantemente eliminada en la orina. Después de la administración de 4 mg As/kg de arsenobetaina 101%, 94,9% y 71,6% respectivamente de la dosis fue eliminada en orina de ratas, ratones y conejos dentro de las 72 horas siguientes a su administración. La eliminación por vía fecal fue 4,5%; 3,8%, y 2,3% de la dosis (WHO, 2001).

En humanos el arsénico inorgánico es eliminado principalmente vía riñón lo que también ocurre en animales. Estudios en hombres humanos adultos que voluntariamente ingirieron un monto conocido de arsénico trivalente o pentavalente, indican que eliminaron entre el 45 y 75 % de la dosis en algunos días, hasta una semana. Pomroy et al. (1980) reportó que 6,1% de una dosis simple de ácido arsénico fue eliminada en las heces fecales en un periodo de 7 días, mientras que un 62,3% de la dosis fue eliminada en la orina. El arsénico puede ser excretado por otras rutas como son: el sudor, las uñas, el cabello y en la leche materna. Sin embargo estas rutas alternativas presentan un grado muy inferior de excreción comparada con la excreción del riñón (WHO, 2001).

1.3.3.4. Toxicidad del Arsénico.

El arsénico ha sido asociado con efectos tóxicos, produciendo consecuencias marcadas en la salud después de ingestión oral o inhalación. El rango de efectos

producidos va desde la letalidad hasta efectos crónicos como cáncer y enfermedades del sistema vascular. Estudios en laboratorio han demostrado que la toxicidad del arsénico depende de su forma molecular y de su estado de oxidación. Se ha reconocido que los compuestos arsenicales inorgánicos solubles son más tóxicos que los compuestos arsenicales orgánicos, y que las formas trivalentes son más tóxicas que las pentavalentes. Muchos órganos y sistemas pueden ser afectados incluyendo la piel, el sistema respiratorio, el sistema cardiovascular, el sistema inmune, el aparato genitourinario, el aparato reproductivo, el sistema gastrointestinal y el sistema nervioso (Abernathy, 2001).

La toxicidad del arsénico depende del estado de valencia. El arsenato inhibe la síntesis de ATP por desacoplar la fosforilación oxidativa, produciendo una disminución del metabolismo. El arsenato también puede reemplazar al fosfato en los monosacáridos sustituidos como en la glucosa-6-fosfato que es transformada a glucosa-6-arsenato. Bajo condiciones estándares el arsenito es más tóxico que el arsenato para organismos acuáticos. El arsenito reacciona con grupos tiol presentes en sitios activos de muchas enzimas y proteínas de tejidos como la queratina en piel, uñas, y cabello. Se une covalentemente a puentes de sulfuro de enzimas, inactivándolas (Tamaki & Frankenberger, 1989).

La ingestión de altas dosis de arsénico usualmente presenta síntomas en 30 a 60 minutos, tiempo que puede ser retardado por la ingestión de alimentos. El envenenamiento por arsénico comienza por la sensación de un sabor metálico o semejante al del ajo, labios calientes y disfagia. Vómitos violentos pueden ocurrir y eventualmente lleva a una hematemesis. Los síntomas gastrointestinales resultan en daños intestinales causados por la dilatación de vasos esplénicos produciendo mucosa basal. La ruptura de estos vasos causa diarrea, sangrado y pérdida de proteínas. La aparición de estos síntomas gastrointestinales produce deshidratación, desbalance electrolítico y puede terminar en hipotensión e hipoxia. Después de la aparición de los síntomas gastrointestinales se produce un fallo masivo de los órganos que puede conllevar a la muerte. Los sobrevivientes a un envenenamiento por arsénico han sido tratados posteriormente por hepatomegalia, melanosis, hemólisis y polineuropatías, resultando en el daño del sistema nervioso periférico (Abernathy, 2001).

Se han reportado envenenamientos fatales después de dosis simples de 2 g (Levin-Scherz et al.), 8 g (Benramdane et al., 1999) y 21 g (Civantos et al., 1995). Se han documentado envenenamiento no fatales, usualmente con tratamiento, al ingerir dosis simples de 1-4 g y 8-16 g (Abernathy, 2001).. En casos de sobrevivientes al envenenamiento por arsénico los síntomas relacionados con el sistema nervioso persistieron de dos a tres años después de la exposición (Abernathy, 2001).

La exposición crónica a bajos niveles de arsénico ha sido muy estudiada en poblaciones humanas. El reporte más antiguo que se conoce data del siglo XIX donde se han descritos efectos como cambios de pigmentación, hiperqueratosis y cáncer de piel; por causa de ingestión de arsénico en medicinas y agua (WHO, 2001). Zaldivar (1974) publicó que en los años 1900 se han reportado numerosos casos de desordenes de la piel en Argentina, Chile, México y Taiwán, los cuales son atribuidos a la ingestión de aguas con altos niveles de arsénico. En 1940 se descubre en una fábrica británica trabajadores con cáncer de pulmón el cual es atribuido a la inhalación de polvo de arsénico en la planta (WHO, 2001).

En casos más actuales reportados como envenenamiento crónico por arsénico, se ha descrita la enfermedad del pie negro (BFD), siendo la que presenta los signos más notorios para su diagnóstico. Esta es una enfermedad del sistema vascular periférico, que produce una gangrena progresiva en las piernas, comenzando por las parte más distales de las mismas (Abernathy, 2001).

Hipertensión está asociada a exposición a largo plazo al arsénico, pero esta evidencia está asociada a estudios seccionales en Bangladesh y Taiwán. Tres estudios realizados en estas zonas relacionan los altos niveles de arsénico en el ambiente al desarrollo de hipertensión. Aunque la hipertensión no es una causa de muerte por sí misma, puede ser un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares graves (WHO, 2001).

En Taiwán estudios realizados han determinado que los habitantes de zonas con alta exposición al arsénico tienen mayores índices de muertes por enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Estudios en otros países no han presentado

resultados significativos debido a que los niveles de arsénico de las zonas de estudio son relativamente bajos (WHO, 2001).

En Taiwán la prevalencia y las tasas de mortalidad de la Diabetes mellitus son mayores en las poblaciones endémicas de zonas donde se presenta la enfermedad del pie negro. Un estudio realizado en Bangladesh presenta resultados similares donde la prevalencia de queratosis fue usada para probar la exposición al arsénico por el organismo (WHO, 2001).

La ingestión de arsénico en agua para el consumo humano ha sido asociada con el incremento de riesgo a desarrollar cáncer de piel. Se ha comprobado que concentraciones relativamente bajas de arsénico en el agua (<300 µg/L) puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de piel. Concentraciones menores (<50 µg/L), pueden aumentar el riesgo de desarrollar lesiones de piel e hiperpigmentación (WHO, 2001).

Muchos estudios relacionados con la toxicidad reproductiva han encontrado una relación con la exposición de arsénico y anomalías durante y después del embarazo como mortalidad, bajos índices de peso, abortos espontáneos, nacimientos prematuros, pre-eclampsia y malformaciones congénitas. Sin embargo no hay evidencias consistentes para probar estos puntos en particular (WHO, 2001).

Estudios en ratones hembras asociaron el consumo arsénico en agua bebible con el aumento de la proliferación de tumores en los pulmones, hígado, gastrointestinales y en la piel. El arsénico inorgánico puede producir aberraciones cromosómicas, afectando la metilación y la reparación del ADN, induciendo a la proliferación celular, transformando células y promoviendo la formación de tumores. Un estudio ha indicado que dosis altas de DMA puede causar cáncer de vejiga en ratas macho (WHO, 2001).

Existen datos de dosis letales medias (LD₅₀) encontrados en experimentos con animales. En ratas se encontró que el LD₅₀ para el DMA va desde 700 hasta 2600 mg/Kg y para el MMA va desde 700 hasta 800 mg/Kg. El LD₅₀ para la arsina se encuentra en 3 mg/Kg, en ratas. El LD₅₀ para la arsenobetaina es >10000 mg/Kg en ratas.

CAPITULO 2: MÉTODOS Y TÉCNICAS.

2.1. Fase de campo.

2.1.1. Cultivo de Trucha Arco Iris.

2.1.1.1. Especie cultivada.

La especie utilizada en este estudio es *Oncorhynchus mykiss*, comúnmente conocida como Trucha Arco Iris. Se adquirieron 165 ejemplares en las piscinas truchícolas de Pailones, pertenecientes al Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA), ubicado en el cantón Rumiñahui, Ecuador.

2.1.1.2. Ubicación geográfica del cultivo.

El cultivo fue realizado en las “Piscinas de Producción Piscícola de la Comuna Jamanco” (3376 m.s.n.m), ubicadas a 800 metros de la orilla suroeste de la laguna de Papallacta, cantón Quijos, provincia del Napo, Ecuador. En la zona se presenta una temperatura media anual de $9,4^{\circ}\text{C} \pm 4,6^{\circ}\text{C}$ y una precipitación anual total de 1615 mm, siendo los meses más lluviosos desde mayo hasta agosto (OEA, 1987).

2.1.1.3. Acondicionamiento de las instalaciones.

Las “Piscinas de Producción Piscícola de la Comuna Jamanco”, habían permanecido en inactividad prácticamente desde su construcción, por lo que presentaban descuido en su mantenimiento y el funcionamiento era inexistente.

Se despejó el colector que toma el agua desde el río Tambo hacia las instalaciones, ya que por un deslave estaba bloqueado con piedras y maleza. Posteriormente, se acondicionó el canal que transporta el agua a fin de que toda el agua captada llegue a las instalaciones sin retornar de nuevo al río.

Debido a la gran acumulación de sedimentos en el desarenador de las instalaciones, el acceso del agua hacia éste fue bloqueado, mediante un baypass hacia la cisterna de distribución. Por lo que la cisterna de distribución de agua servía como desarenador. La cisterna fue limpiada y se retiraron los sedimentos que en esta existían.

Además se limpiaron los estanques circulares donde se realizaría el cultivo. Los estanques fueron lavados con detergente y cepillados fuertemente.

La maleza ubicada en los perímetros de los estanques fueron cortada para facilitar el movimiento por las instalaciones. También se cortaron la maleza que había crecido en el canal de desagüe hacia el río Tambo. Se despejaron además los desagües de los estanque y se retiraron las piedras y escombros.

Adicionalmente, se colocaron nuevos tubos de PVC como desagüe en los estanques que se utilizarían en el estudio. Cada tubo con dimensiones: 10 cm de diámetro y 80 cm de largo. En extremo superior de cada tubo se incorporó un cilindro de malla plástica de 0,5 cm de poro.

Finalmente, las piscinas fueron llenadas con agua y se controló que el caudal sea constante para cada una.

Notar que, el acondicionamiento de las instalaciones fue realizado con la ayuda de estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército, del cuidador contratado para el estudio y habitantes de la zona; dos meses antes de la siembra y una semana antes de la siembra.

2.1.1.4. Transporte y siembra.

Los peces a utilizarse en la siembra antes de su transporte a Papallacta fueron pesados, contados y seleccionados, por parte del personal de las piscinas truchícolas de Pailones. Los peces seleccionados fueron encerrados en jaulas y no se les dio alimentación en las últimas 24 horas previas al transporte.

Se colocaron 165 truchas en 8 bolsas del plástico de 50 cm de alto por 35 cm de ancho. Cada bolsa fue previamente llenada con agua en aproximadamente 40% de su capacidad. Una vez que los peces, estuvieron colocados dentro de cada bolsa, se procedió a saturar la bolsa con oxígeno y luego se la cerró herméticamente con una cinta de goma para evitar la fuga del gas.

Las bolsas con truchas se transportaron el 4 de mayo del 2006, a tempranas horas del día (6h30) para evitar la luminosidad y calor del sol. De esta manera se cuidó que el estrés del animal en el viaje sea lo más bajo posible.

Una vez en las instalaciones de Jamanco, cada bolsa fue cuidadosamente abierta y se vertieron los animales en los estanques circulares, cuidadosamente. Se colocaron 82 peces en el estanque No. 1 y 83 peces en estanque No.2.

Por un periodo de dos días después de la siembra, se suspendió la alimentación a los animales, hasta lograr la adaptación a su nuevo medio.

2.1.1.5. Condiciones de cultivo.

Se sembraron 165 truchas en dos estanques circulares de 2,5 m³ de capacidad, cada uno. Los estanques fueron llamados No. 1 y No. 2. Se repartieron al azar 82 peces en estanque No. 1 y 83 peces en estanque No. 2.

El caudal de agua se calculó según la metodología propuesta por Jover et al., en la que se toma en cuenta la cantidad de agua necesaria para aportar oxígeno a los animales y el necesario para eliminar los productos excretados. El caudal de agua ajustado para cada uno de los estanques fue de 3,6 m³/h. y la tasa de renovación de fue de 1,44 cambios/h.

El día de la siembra se registraron los siguientes valores en los parámetros físicoquímicos del agua: temperatura máxima de 16,7 °C (al medio día), pH de 7,60 y oxígeno disuelto de 7,5 mg/L. En muestreos subsiguientes la temperatura media fue de 16°C a 17°C (al medio día), el pH medio de 7,5 a 7,6 y el oxígeno disuelto de 8 mg/L a 9 mg/L.

Las truchas fueron sembradas con un peso medio de 90 gr,(dato entregado por personal de las piscinas Pailones). Tomando en consideración esta información, la densidad de carga en el estanque No. 1, fue de 2,95 kg/m³ y en el estanque No. 2 fue de 2,99 kg/m³.

El tiempo de cultivo fue de 61 días, del 5 de junio al 5 de agosto del 2006. Los estanques fueron limpiados cada quince días.

2.1.1.6. Alimentación.

La alimentación fue realizada a voluntad, dos veces al día (8h00 y 16h00) durante todo el tiempo de cultivo. Se utilizó balanceado para trucha marca PICIS de 1/8 y 40% de proteína durante las primeras cinco semanas de cultivo; en las tres últimas semanas se utilizó balanceado para trucha marca PICIS de 3/4 y 40% de proteína.

Se registró a diario las horas y la cantidad aproximada de alimento proporcionado a cada estanque.

2.1.2. Muestreo de peces.

2.1.2.1. Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra se calculó siguiendo la metodología propuesta por Fernández (1996). Se utilizó la formula general para un universo finito o cuya población sea menor a 100 000 individuos, que está dada de la siguiente manera:

$$n = \frac{pqN\sigma^2}{E^2(N-1) + pq\sigma^2}$$

Donde:

n = número de elementos de la muestra.

N = número de elementos del universo

σ = nivel de confianza elegido.

E = error de estimación permitido.

p = probabilidad que se encuentre la característica estudiada en el universo.

q = probabilidad que se no se encuentre la característica estudiada en el universo.

El valor es N asignado fue 82 para estanque No. 1 y 81 para el estanque No. 2 debido a que murió un pez de cada estanque durante el cultivo. Los valores de p y q fueron p = 0,96 y q = 0,04 puesto que en investigaciones realizadas en otros países se ha

encontrado arsenobetaina en todas la muestras analizadas. Por esta razón se asumió un margen de certeza del 96 %. El valor de σ fue de 2 para obtener un nivel de confianza del 95,5 % y el valor de E fue de 0,06 ya que el error de estimación máximo permitido es de 6 %.

El número de muestras escogidas al azar en ambos estanques fue de 28, el cual fue obtenido de los cálculos realizados al respecto.

2.1.2.2. Determinación de peso y talla.

La medición fue realizada el día de finalización del cultivo. Los peces fueron trasladados con ayuda de una atarraya hacia un recipiente de 20 litros de capacidad con aireación manual, donde se colocó aceite de clavo de olor a manera de anestésico hasta llegar a una concentración de 20 mg/L. Los peces fueron anestesiados por lotes de 15 unidades.

El pesaje se realizó con una balanza mecánica de dos decimales de precisión. Los peces fueron pesados vivos y con todos sus órganos.

Posteriormente se midió con una cinta métrica flexible, la longitud de cada animal largo, desde la boca hasta la orquilla de la cola, y el ancho, desde el inicio anterior de la aleta dorsal hasta la línea media del abdomen.

Se identificaron los animales en el registro con el siguiente formato: ###, donde el primer dígito desde la izquierda indica el número del estanque del que proviene el animal y los dos siguientes dígitos corresponden al orden en que fue medido.

2.1.2.3. Recolección de muestras de peces para análisis en laboratorio.

Los peces que fueron pesados y medidos, fueron faenados. La faena consistió en realizar un corte a cada uno de los peces seleccionados, en la arteria carótida ubicada por encima del tabique inferior que divide las agallas, hasta lograr el completo desangramiento del animal. Una vez desangrado el pez, se lo desvisceró y se lo empacó en un funda de plástico limpia de 25 cm x 30 cm, cuidando que no quede aire en el

interior ni materia extraña a la muestra. Cada bolsa plástica fue sellada con cinta de embalaje. Se identificó la muestra con el mismo código del pesaje y medición.

Las muestras fueron transportadas en recipientes refrigerados hasta el laboratorio de química del CEINCI, situado en el campus de la ESPE, Sangolquí. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.3. Muestreo de agua.

2.1.3.1. Recolección de muestras.

Los frascos utilizados para la recolección de muestras de agua fueron de plástico, con un volumen útil de 500 ml, tapa rosca y contratapa, nuevos y limpios. Para la toma de la muestra los frascos fueron enjuagados con agua del punto de muestra a tomarse. Se rotularon los envases con una identificación y la fecha de muestreo.

Luego, se tomaron dos muestras por cada punto de muestreo. Los puntos de muestreo fueron en los afluentes de cada estanque y en el lado opuesto del afluente a 20 centímetros del borde y a una profundidad de 10 centímetros por debajo de la superficie del agua. Una de las dos muestras de cada punto de muestreo fue acidificada con cinco gotas de Ácido Nítrico concentrado.

Las muestras fueron transportadas en cadena de frío hasta llegar al laboratorio de química del CEINCI en el campus de la ESPE, en Sangolquí. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las muestras se recolectaron horas antes de iniciarse el cultivo de peces y en otra ocasión al cumplirse un mes de cultivo.

2.1.3.2. Determinación de pH y oxígeno disuelto.

El pH de la piscinas se midió in situ con un equipo METTLER TOLEDO X-matePro MX300 equipado con un electrodo InLab®482 Combination pH. La muestra fue recolectada en un recipiente plástico para realizar la medición.

El oxígeno disuelto de las piscinas se midió in situ con el mismo equipo, pero equipado con un electrodo InLab®681 probe. La medición fue hecha directamente en agua de las piscinas.

Los parámetros de pH y oxígeno disuelto fueron medidos antes de empezar el cultivo, en la siembra, al cumplirse un mes de cultivo y en la finalización del cultivo.

2.2. Fase de laboratorio.

2.2.1. Ubicación geográfica

Toda la fase de laboratorio se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la Escuela Politécnica de Ejército, ubicada en el cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha; a excepción de los ensayos de liofilización de músculo de trucha y análisis de Arsenobetaina en GC-MS, que fueron realizados en el laboratorio de biología molecular del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador y en los laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana, correspondientemente; ambos ubicados en el distrito metropolitano de Quito.

2.2.2. Materiales y reactivos.

Todos los materiales de vidrio, plástico y cerámica fueron lavados con agua corriente y detergente alcalino. Posteriormente se los lavó con Ácido Clorhídrico al 10% y se los enjuagó con agua corriente. Finalmente se realizó un enjuague con agua ultra pura.

Los reactivos utilizados para análisis fueron de grado analítico y se comprobó en su ficha técnica la cantidad de Arsénico presente en el reactivo.

El agua utilizada para realizar las soluciones de reactivos y estándares fue de grado ultra puro 0.04 mS/cm, obtenida del aparato Millipore Direct-Q3.

Para las mediciones de Arsénico en el espectrofotómetro de absorción atómica, se utilizó el estándar AAAS1-1 de Inorganic Ventures, $1000 \pm 10 \mu\text{L}/\text{mL}$, 1,4 % HNO_3 .

De esta solución se preparó una solución madre de 100 ml de 10 mg/mL. Para la curva de calibración del equipo se preparó 50 ml de una solución 0,1 mg/mL a partir de la solución de 10 mg/mL.

Para la determinación de arsenobetaina se utilizó el estándar CRM 626 de 1031 \pm 6 mg/Kg, certificado por la Comisión Europea de Materiales de Referencia.

2.2.3. Análisis de aguas.

2.2.3.1. Determinación de Arsénico total.

Las mediciones de Arsénico en muestras de agua fueron realizadas bajo la metodología de espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros, citada en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de la APHA 1992.

Para cuantificar Arsénico total, se utilizó el espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 100 acoplado con el generador de hidruros Perkin Elmer MHS-15. Al espectrómetro se acopló una lámpara de descarga de electrones activada por un sistema de descarga de electrones Perkin Elmer EDL System 2.

El método consistió en colocar un volumen de muestra conocido en el reactor del generador de hidruros, en cuyo interior había 10 mL de una solución de Ácido Clorhídrico (HCl) al 1,5% (v/v). El generador de hidruros proporciona un volumen de solución de Borohidruro de Sodio (NaBH_4) al 3% (p/v) contenido en otro recipiente del equipo. En el reactor se produce una reacción de reducción y formación de Arsina (H_3As), la cual es transportada mediante el gas de arrastre, Argón al 99,99999% de pureza, hacia una celda de cuarzo calentada por la llama del quemador del espectrómetro de absorción. En el quemador de quema una mezcla de Acetileno 99,995% de pureza y aire. El haz de luz enviado por la lámpara de descarga electrones para As, atraviesa la celda de cuarzo y un detector del espectrómetro mide la absorbancia de la muestra. Las condiciones del equipo fueron las siguientes: Longitud de onda: 193.7 nm, ancho y altura de la apertura: 0.7 nm, Tiempo de integración: 12 segundos.

En cada sesión de medición, se realizó la alineación de la celda y la curva de calibración con tres puntos: 10 ng (100 μL), 25 ng (250 μL) y 50 ng (500 μL), utilizando la solución madre de 0.1 mg $\text{As}_\text{T}/\text{L}$ preparada anteriormente. Únicamente se admitieron curvas de calibración con coeficiente de correlación mayor a 0.97.

Se midieron tanto muestras acidificadas como sin acidificar. El volumen de muestra que se depositó en el reactor fue de 100 μL a 1000 μL , el volumen seleccionado de muestra dependió del valor de concentración obtenido, cuidando que éste se encuentre dentro del rango de la curva de calibración.

2.2.3.2. Separación de Arsénico III y Arsénico V.

La separación de las especies arsenicales se realizó en las muestras acidificadas. Para el efecto 50 mL de muestra fueron ajustados a un pH entre 4 y 5 con una solución de Ácido Clorhídrico al 1% (p/v) y con una solución de Hidróxido de sodio al 1% (p/v).

Estas muestras se hicieron pasar por mini-columnas preparadas con pipetas pasteur (5 cm de largo por 3 mm de diámetro) y conteniendo resina de intercambio aniónico A-400.. Se utilizó una mini-columna para cada muestra. El flujo de la muestra fue regulado a doce gotas por minuto. En el efluente de la mini-columna se midió $\text{As}(\text{III})$ y en la muestra original se determinó Arsénico total. La concentración de $\text{As}(\text{V})$ fue determinada por diferencia entre Arsénico total y $\text{As}(\text{III})$.

2.2.3.3. Determinación de Cloruros.

Se utilizó el método propuesto por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de la APHA (1992), Medición de Cloruros por Argentometría, Método 4500 Cl⁻ B. Para analizar los cloruros, la muestra, a un pH neutro o ligeramente alcalino, se titula con nitrato de plata (AgNO_3), usando como indicador cromato de potasio (K_2CrO_4). El cloruro de plata AgCl , precipita primero y al terminarse los cloruros, el AgNO_3 reacciona con el K_2CrO_4 formando un precipitado rojo ladrillo de Ag_2CrO_4 .

El procedimiento consistió en colocar 3 ml. de la muestra de agua en vaso de precipitación de 50 ml., cinco gotas de agua oxigenada de 20 volúmenes y una gota de

K_2CrO_4 al 5 %. Luego, la muestra se tituló con $AgNO_3$ hasta obtener un viraje del color de la solución de amarillo a rojo ladrillo.

La normalidad del $AgNO_3$ se determinó titulado una solución de 200 mg/mL de $NaCl$, preparada con agua ultra pura.

2.2.3.4. Determinación de Carbonatos y Bicarbonatos.

Se utilizó el método propuesto por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de la APHA (1992), Determinación de Alcalinidad en agua, Método 2320 B. En este método, la alcalinidad es determinada por titulación de la muestra con una solución valorada de HCl , mediante dos puntos sucesivos de equivalencia, indicados por medio del cambio de color de dos indicadores ácido-base adecuados.

Al agregarse a la muestra de agua el indicador de fenolftaleína y aparece un color rosa, esto indica que la muestra tiene un pH mayor que 8.3 y es indicativo de la presencia de carbonatos. Se procede a titular con HCl valorado, hasta que el color rosa vire a incoloro, con esto, se titula la mitad del $CO_3^{=}$.

Posteriormente se agregan unas gotas de indicador de azul bromofenol, apareciendo una coloración azul y se continúa titulado con HCl hasta la aparición de una coloración verde. Con esto, se titula los bicarbonatos (HCO_3^-) y la mitad restante de los carbonatos ($CO_3^{=}$).

Si las muestras de agua tienen un pH menor que 8.3 la titulación se lleva a cabo en una sola etapa. Se agregan unas gotas de indicador de azul de bromofenol, apareciendo una coloración azul y se procede a titular con solución de HCl hasta la aparición de un color verde con eso se titula los HCO_3^- .

El procedimiento consistió en colocar 3 ml de muestra de agua en un vaso de precipitación de 50 ml. Debido a que el pH de las muestras fue inferior a 8,3; únicamente se agregó una pizca de azul de bromofenol a la muestra apareciendo un color azul y luego se tituló con HCl al 0,02N hasta la aparición de un color verde.

2.2.3.5. Determinación de Sulfatos.

Se utilizó una variación del método propuesto por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de la APHA (1992), Determinación de Sulfatos por turbidimetría en agua. Método 4500 SO_4^{2-} A-E. El método consistió en tratar la muestra con cloruro de bario (BaCl_2), en medio ácido, formándose un precipitado blanco de sulfato de bario. Para este procedimiento se requiere de un solvente acondicionador, Tween 20, a fin de modificar la viscosidad de la muestra y así permitir que el precipitado de BaSO_4 se mantenga en suspensión. La turbidez de este precipitado se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm.

El procedimiento consistió en preparar las siguientes soluciones para el método: 1 L de solución patrón pesando 0,1775 g de Sulfato de Sodio Na_2SO_4 ; HCl 1:10; Tween 20 al 25% (v/v); 100 mL de una solución 10 gr de BaCl_2 + 20 mL de Tween 20 al 25%(v/v).

Se realizó una curva calibración siguiendo los valores proporcionados por la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Cantidades de reactivos utilizados para preparar la curva de calibración para la medición de sulfatos.

No.Tubos	Blanco	1	2	3	4	5	6
Sln.Patrón (SO_4) ⁻	0	1	3	5	7	9	10
Agua destilada	39	38	36	34	32	30	29
HCl 1:10	1	1	1	1	1	1	1
Sln. de BaCl_2	5	5	5	5	5	5	5
Concentración correspondiente (mg/L)	0	3	9	15	21	27	30

Los tubos preparados fueron medidos en el espectrofotómetro de luz visible/UV a 650 nm de longitud de onda. Se realizó una regresión lineal confrontando los valores de absorbancia versus las concentraciones correspondientes.

Las muestras fueron preparadas añadiendo en un tubo de ensayo 18,5 mL de muestra, 0,5 mL de HCl 1:10 y 2,5 mL de solución de BaCl₂; los tubos se agitaron fuertemente y se cuantificaron en el espectrofotómetro de luz visible/UV a 650 nm.

2.2.4. Análisis de Arsénico en peces.

2.2.4.1. Corte de las muestras.

A cada pez escogido para los análisis, se le realizaron cuatro cortes para extraer los músculos laterales izquierdos (Figura 2.1.). El primer corte fue realizado transversalmente desde la base del cráneo, bordeando las cavidades de las agallas hasta llegar al corte longitudinal del abdomen. El segundo corte se lo realizó longitudinalmente en la línea media dorsal desde la base del cráneo hasta el comienzo de la aleta dorsal. El tercer corte se lo realizó en forma transversal desde el comienzo de la aleta dorsal hasta el corte abdominal. El cuarto corte fue el corte del desviscerado realizado desde el ano, hasta la mandíbula inferior del pez.



Figura 2.1. Esquema de área de corte para obtención de músculos.

Una vez que la piel fue retirada y eliminada, la sección aislada de cada pez fue cortada longitudinalmente y guardada en una caja petri con su respectiva identificación, en congelación a -20°C.

2.2.4.2. Determinación de Arsénico total.

2.2.4.2.1. Preparación y digestión de las muestras.

De cada muestra se cortó aproximadamente 1,5 gramos de músculo de pez sin piel y se lo puso a secar a 105 °C durante 12 horas en un horno estufa (Julshamn, 2000). Una vez seca la muestra se la trituroó en el mortero hasta obtener un polvo fino.

Se siguió el proceso de digestión propuesto por Montoro (2003), en el que se utiliza una digestión ácida y una mineralización en base seca. Se pesó 0,250 gr del polvo de muestra, en un crisol de porcelana de 30 mL, utilizando la balanza analítica. Se añadió 5 mL de HNO₃ 50% (v/v) y 1 mL de agente coadyuvante de la mineralización [MgNO₃ 20% (p/v) + MgO 2% (p/v)].

Se evaporó la mezcla hasta la sequedad, empleando una plancha eléctrica y una lamina de amianto, dentro de una campana extractora de gases, cuidando que su puerta esté cerrada para evitar la inhalación de gases tóxicos. La evaporación llevó un tiempo de 3 a 4 horas.

Se mineralizó en un horno mufla Sybron Thermoline, aplicando un programa temperatura-tiempo, en el que tras una subida paulatina de la temperatura, las muestras permanecieron 12 horas a 450 °C. En el caso de que las cenizas obtenidas no fueron blancas, se adicionó 5 ml de HNO₃ 10% (v/v) y se aplicó nuevamente el programa temperatura-tiempo.

Tras la mineralización, las cenizas blancas se disolvieron en 5 ml de HCl 6 M y 5 ml de mezcla reductora [KI 5% (p/v) + ácido ascórbico 5% (p/v)] y se las dejó reaccionar por 30 minutos.

Transcurridos los 30 minutos, la solución obtenida, se filtró a través de papel filtro y se aforó la solución a 25 ml con agua ultra pura. Una vez aforada se midió la concentración de Arsénico en el espectrómetro de absorción atómica, bajo las mismas condiciones indicadas en el método para lectura de arsénico total en muestras de agua. El volumen de muestra empleado para la medición de As total fue de 500 µL. A fin de verificar la confiabilidad de los análisis, se realizaron tres mediciones por muestra.

Las digestiones fueron hechas en lotes de doce muestras y en cada lote se procesó un blanco que fue preparado de igual forma que las muestras.

También se procesaron y analizaron las muestras de balanceados utilizados en la alimentación de los peces de manera idéntica a las muestras de músculo para la determinación de arsénico total.

2.2.4.3. Determinación de Arsenobetaina.

2.2.4.3.1. Liofilización de músculo de trucha.

Cada muestra de músculo fue cortada con un bisturí en partículas de tamaño máximo de 0,5 cm de diámetro y colocadas en viales de vidrio de 60 mL de capacidad para un liofilizador. Los viales fueron cubiertos con una tapa hermética de goma y puestos en precongelación a -20 °C.

Se utilizó el liofilizador Labconco Freeze Dry System 77510 del laboratorio de biología celular del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, con capacidad para remover hasta 4,5 litros de agua. Las muestras fueron liofilizadas en lotes de diez a una temperatura de -50 °C y un vacío de 90×10^{-3} mbar, durante ocho horas. Una vez liofilizadas, las muestras fueron trituradas con ayuda de un mortero, hasta lograr un polvo fino, y posteriormente fueron guardadas herméticamente bajo refrigeración a 4 °C.

2.2.4.3.2. Extracción de Arsenobetaina.

Se utilizó una metodología similar a las propuestas por Suñer, (2001) y Pizarro (2003), la que utiliza extracción con metanol-agua 1:1, partiendo de muestras liofilizada de músculo de pez. Para el efecto, se pesó 1 gr. de polvo liofilizado de cada una de las muestras dentro de un tubo para centrifugar de 50 mL con tapa rosca y base cónica. Luego, se añadieron a los tubos 10 ml de una solución metanol:agua (1:1). Los tubos se agitaron por 15 minutos en un agitador mecánico vertical. A continuación, los tubos con muestra fueron expuestos a un baño de ultrasonido focalizado durante 5 minutos y posteriormente fueron centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. El proceso de extracción se repitió una vez más y los extractos se combinaron.

El la mezcla final se pasó a través de un filtro de membrana de nylon Whatman 0.45 µm., y se la depositó en viales de 2 mL para cromatografía. Los viales fueron sellados herméticamente, identificados y almacenados en refrigeración a -4 °C.

2.2.4.3.3. Determinación de arsenobetaina en cromatografía de gases con detección de ionización en llama (GC-FID).

El equipo utilizado para esta determinación fue un Perkin Elmer Autosystem Gas Chromatography con detección de ionización en llama; la interfase de conexión a la computadora es PE Nelson NCI 900 y se utiliza el programa Turbochrom Navigator Versión 4.1 para el procesamiento de datos y análisis de cromatogramas.

Se preparó un estándar de 0,250 mg/Kg de arsenobetaina, a partir del estándar de arsenobetaina CRM 626 de 1031 mg/Kg, certificado por la Comisión Europea de Materiales de Referencia.

La metodología utilizada y las condiciones fijadas en la cromatografía fueron desarrolladas en el curso de la investigación. Se logró estandarizar el método según los siguientes parámetros:

Columna:	Capilar DB-5 J&W Scientific, 95 % dimetilpolisiloxano, 5 % fenil. - 60 °C hasta 300 °C.
Dimensiones de columna:	30 m de largo, 0,53 mm de diámetro interno y 1,5 µm de película.
Volumen de Inyección:	2 µL
Tipo de Inyección:	Inyección automática, tipo splitless. Dos repeticiones por muestra.
Temperatura inyector:	110 °C.
Programa de temperatura:	30 °C, 5 minutos; rampa de 12 °C/minuto; 100 °C, 4 minutos.
Tiempo total de programa:	14,8 minutos.
Tiempo de equilibrio:	30 segundos.

Atenuación:	2.
Flujo de Hidrógeno:	47,6 ml/minuto.
Flujo de Aire:	185,4 ml/minuto.
Gas acarreador:	Helio 99,99995 % puro.
Presión de gas acarreador:	5,7 psi.

La columna fue acondicionada y equilibrada antes de empezar los análisis. La columna se mantuvo durante 8 horas a 150 °C y con flujo de Helio. La jeringa del inyector automático fue limpiada con acetona, agua y metanol. El inyector automático fue programado para dos limpiezas antes de cada inyección y dos limpiezas después de cada inyección.

Se corrieron 8 muestras diarias con dos repeticiones cada una. Antes de cada análisis diario se corrió un estándar de arsenobetaina y una muestra de solvente. Diariamente al encender el equipo se estabilizó la columna con una corrida del programa sin muestra. Para la cuantificación, fueron analizados los picos que poseían tiempos de retención entre 5,0 y 7,0 minutos. La concentración de cada muestra se la calculó, de la relación entre el área de los picos del estándar y el área de los picos de las muestras.

2.2.4.3.4. Determinación de Arsenobetaina en cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS).

El método fue desarrollado con colaboración del Laboratorio del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana, en las instalaciones de dicha institución. Se utilizó cromatógrafo de gases Varian 3900, acoplado a un detector de espectrometría de masas Varian Saturn 2100D.

Se preparó un estándar de 0,258 mg/Kg de Arsenobetaina, a partir del estándar de Arsenobetaina CRM 626 de 1031 mg/Kg, certificado por la Comisión Europea de Materiales de Referencia.

Se estandarizó el método según los siguientes parámetros:

Columna:	Varian Factor – Four, Capillary Column VF - 5 ms. 95 % dimetilpolisiloxano, 5 % fenil. Hasta 325 °C.
Dimensiones de columna:	30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de película.
Rango de masas m/z:	40 – 650.
Volumen de Inyección:	2 µL
Tipo de Inyección:	Inyección manual, tipo splitless.
Temperatura inyector:	260 °C.
Programa de temperatura:	40 °C, 1 minuto; rampa de 10 °C/minuto; 100 °C, 2 minutos; rampa de 30 °C/minuto y 240 °C, 2 minutos.
Tiempo total de programa:	15,67 minutos.
Tiempo de equilibrio:	2 minutos.
Gas acarreador:	Helio 99,999990 % puro.
Flujo de gas acarreador:	1 ml/minuto.

Se analizaron diez extractos de muestras anteriormente analizadas en GC-FID para confirmar datos. Las identificación de las muestras analizadas son las siguientes: Siembra, 109, 111, 118, 119, 123, 211, 212, 214 y 222.

CAPITULO 3: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

3.1. Calidad de agua del río Tambo utilizada en las piscinas piscícolas de la Comuna Jamanco.

De los parámetros monitoreados para determinar la calidad de agua para el cultivo de truchas arco iris, en las aguas de las piscinas de producción piscícola de la Comuna Jamanco, el de mayor interés fue la concentración de arsénico. Al inicio del cultivo las concentraciones de arsénico total en la toma de agua de cada una de las piscinas tuvieron valores entre 452 µg/L y 481 µg/L (Tabla 3.1.). Estos valores se encuentran muy por encima del valor máximo permitido por la normativa ambiental ecuatoriana, que en el Texto Unificado de Legislación Ambiental, libro VI, anexo I

(2002), según los “Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario”, establece un valor máximo de de 0,05 mg/L para el parámetro arsénico.

Sin embargo en muestreos subsiguientes se encontraron concentraciones de arsénico de alrededor de 150 $\mu\text{g/L}$ e incluso llegando a niveles mucho más bajos de 9 $\mu\text{g/L}$ en días de altas precipitaciones fluviales. Adicionalmente en muestreos realizados en salidas de campo organizadas por el Centro de Investigaciones Científicas de la ESPE, se encontró que las muestras de agua tomadas en el río Tambo a la altura de la toma de agua para las piscinas piscícolas de Jamanco, presentan concentraciones de arsénico entre 100 $\mu\text{g/L}$ y 153 $\mu\text{g/L}$ (Cumbal et al., 2007).

La gran variación que presentan los datos sobre concentración de arsénico en las aguas utilizadas para el cultivo de truchas arco iris en las piscinas piscícolas de Jamanco, se debe principalmente a dos factores. El primer factor son las precipitaciones fluviales, debido a que cuando éstas fueron abundantes y persistentes, dos vertientes que bajan de la montaña sur occidental se desbordan, inundando con sus aguas el canal que comunica el río Tambo con las piscinas. El agua de estas vertientes no posee arsénico y consecuentemente produce una dilución del metaloide presente en el agua del río captada por el canal, por lo tanto disminuyendo las concentraciones de arsénico en el agua que llega a las piscinas. El segundo factor se debe a la inestabilidad del terreno que se encuentra junto a la toma de agua de las piscinas en el río Tambo, ya que en esa sección se presentan frecuentes deslaves. Estos deslaves provocan que los sedimentos y la materia sólida se depositen en el agua, aumentando las concentraciones de arsénico por el lavado que sufren las rocas y sedimentos. Los deslaves producen posteriormente taponamiento del canal de alimentación de agua y una reducción del caudal en el mismo. Cabe recalcar que el día anterior a la siembra de los animales hubo un deslave diez metros río arriba de la toma de agua con la consecuente elevación de los niveles de arsénico.

De igual manera se debe notar que como resultado de la separación de especies arsenicales en las muestras de agua, se obtuvieron valores de concentración de arsénico trivalente (As III) y concentraciones de arsénico pentavalente (As V). La concentración media de arsénico trivalente fue de 30 $\mu\text{g/L}$ en la piscina 1 y de 25 $\mu\text{g/L}$ en la piscina 2

(Tabla 3.1.), lo que representa entre el 5 % y 7 % del arsénico total medido en el agua, mientras que el arsénico pentavalente representa entre el 93 % y 95 % del arsénico total medido en el agua de las piscinas de cultivo.

Los valores elevados de arsénico, en el agua que el río Tambo aporta a las piscinas de producción piscícola son indicadores de la contaminación por arsénico que sufre la zona. Se ha reportado que varios “ojos de agua” de origen geotermal a lo largo del cauce del río Tambo aportan aguas con concentraciones de arsénico entre 1030 µg/L y 7853 µg/L (Cumbal et al., 2007).

Tabla 3.1. Valores de parámetros analizados para determinar la calidad del agua utilizada para el cultivo de truchas arco iris en las piscinas de producción piscícola de la Comuna Jamanco.

Parámetros	Unidad de medida	Piscinas de cultivo.	
		1	2
Temperatura del agua	°C	9 – 16	9 – 16
Oxígeno disuelto	mg/L	7,5 – 9	7,5 – 9
Potencial Hidrógeno	pH	7,7	7,6
Alcalinidad como carbonatos o bicarbonatos	mg/L	121,98	121,98
Sulfatos	mg/L	36	35,69
Cloruros	mg/L	37,7	40,9
Arsénico Total	µg/L	8 – 452	9 – 481
Arsénico (III)	µg/L	30	25
Arsénico (V)	µg/L	422	456

Otro aspecto importante para recalcar, es que las concentraciones de arsénico de las muestras tomadas en tubo de ingreso de agua a las piscinas, fueron de dos a tres veces menores que las concentraciones de las muestras de agua tomadas en la parte opuesta a las entradas de agua en las piscinas. Este fenómeno es producido por la forma de las piscinas y por la disposición de la entrada y salida de agua en las mismas, lo que ocasiona las denominadas zonas muertas y remolinos, que dificultan el recambio de agua y favorecen a la acumulación de sedimentos y productos del metabolismo de los

animales. Es por estas circunstancias que en estas zonas de difícil recambio de agua las concentraciones de arsénico son mayores que las concentraciones del agua de ingreso.

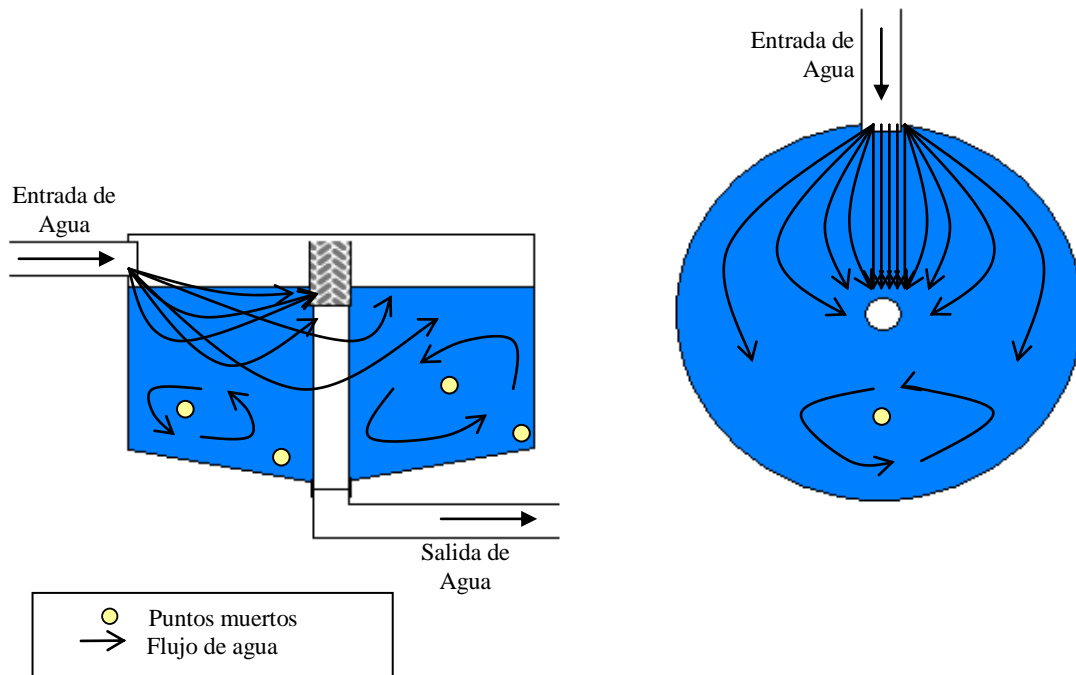


Figura 3.1. Esquema de las direcciones de las corrientes de agua dentro de las piscinas de cultivo.

Con respecto a los otros parámetros para determinar la calidad del agua para el cultivo de truchas, todos estuvieron dentro de los rangos recomendados en la Tabla 1.1.. El único parámetro que está fuera del rango para el cultivo de truchas es la temperatura. Blanco (1994) recomienda que la temperatura media de cultivo esté entre los 15 °C y 16 °C, puesto que en este rango se han reportado los índices de conversión alimenticia óptimos para una producción truchícola. No obstante la temperatura media en la zona de la laguna de Papallacta es de 9 °C, cuyos efectos sobre el crecimiento de los animales serán discutidos más adelante.

3.2. Cultivo de truchas arco iris.

Los parámetros típicos para un cultivo de truchas arco iris como el realizado en Jamanco son: mortalidad, crecimiento, conversión alimenticia y condición de los animales. El análisis de estos parámetros sirve para tener una visión global del comportamiento fisiológico de los animales durante el tiempo de cultivo.

Se tomó la decisión de adquirir truchas en etapa de crecimiento basada en que la truchas en esta etapa, utilizan el alimento ingerido para generar tejidos estructurales cómo el muscular, óseo y cartilaginoso; en mayor proporción que otros tejidos acumuladores cómo el adiposo. De esta manera las sustancias acumulables, cómo el arsénico, tendrán su mayor tasa de acumulación en los tejidos musculares, durante la etapa de crecimiento de los animales.

La mortalidad en el cultivo de los peces fue baja. Apenas cuatro truchas murieron durante el tiempo de cultivo, lo que significa un 2,43 % de la población inicial sembrada, obteniéndose una mortalidad de 1,2 % mensual. De las cuatro truchas muertas, dos murieron en los días siguientes de la siembra, una murió un mes después de la siembra y la restante a una semana por ataque de un perro salvaje. Según Alvarado y Bastardo (1983), se espera una mortalidad aproximada del 20 %, durante la fase de crecimiento, hasta alcanzar un peso entre 200 y 300 gramos, lo que se logra entre 12 y 16 meses, es decir una mortalidad mensual entre 1,25 % y 1,66 % aproximadamente. A pesar de las causas de muerte de las truchas en cultivo fueron muy diversas, se obtuvieron resultados similares a los reportados por Alvarado y Bastardo (1983), esto es un indicador que el agua y las condiciones ambientales aportaron un medio adecuado para la supervivencia de los animales. Se atribuye las muertes de las dos primeras truchas al estrés del transporte y siembra así como al maltrato sufrido durante estos dos procedimientos. La tercera trucha murió luego de una limpieza de la piscina de cultivo, posiblemente por el estrés y maltrato sufrido durante este procedimiento.

Para analizar al crecimiento se determinó el peso y la talla de los animales. Los animales fueron sembrados con un peso medio de 90 gramos, una longitud media de 20 centímetros y un ancho de 6 centímetros, según el personal de las piscinas piscícolas de Pailones, IASA - ESPE. Después de 61 días de cultivo los animales llegaron a un peso medio de $148,89 \pm 28,58$ g., lo que significa que hubo una ganancia de 58,89 g. en peso, aproximadamente (Tabla 3.2.) cómo se puede observar en el Anexo 2. Sin embargo, la desviación estándar de los pesos de los animales representa el 19,19 % de la media calculada, lo que indica que la muestra recolectada fue bastante variable. Esta amplia variación estándar demuestra que la ganancia de masa corporal en los animales no fue homogénea existiendo animales que ingirieron más alimento que otros y/o que

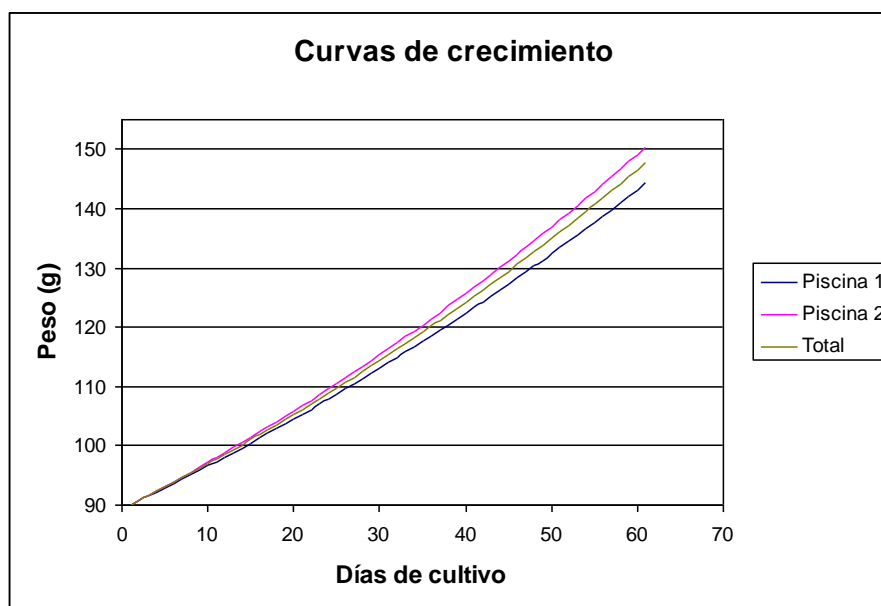
asimilaron mejor el alimento. La razón de esta diferencia entre los individuos puede estar dada por las aptitudes genéticas que proporcionan a ciertos animales mayor capacidad de conversión alimenticia y/o mayor jerarquía sobre otros peces en el momento de la alimentación.

Tabla 3.2. Parámetros generales de crecimiento de truchas arco iris al término del cultivo de 61 días.

	Piscina 1	Piscina 2	Total
Peso con vísceras (g)	145,88 ± 20,17	151,90 ± 36,99	148,89 ± 28,58
Peso sin vísceras (g)	118,45 ± 16,83	111,30 ± 31,18	114,88 ± 23,78
Longitud (cm)	25,19 ± 1,62	22,92 ± 3,76	24,06 ± 2,70
Ancho (cm)	7,56 ± 0,45	6,96 ± 0,74	7,26 ± 0,56
Peso ganado (g)	55,88	61,9	58,85
TCE (%/día)	0,79	0,86	0,83
FCA (g alimento/g trucha)	3,23	2,94	3,03
Índice de Condición	0,91	1,26	1,06

La tasa de conversión alimenticia (TCE) indica el porcentaje de peso diario que aumenta el animal con respecto al peso actual. Las TCE obtenidas en cultivo (Tabla 3.2.) fueron relativamente bajas comparadas con datos de la piscifactoría de Pailones del IASA, lugar de adquisición de animales, donde se calculó una TCE de 1,52 (Ortiz et al., 2005). No existió variación significativa de las TCE entre las dos piscinas como se puede observar en la Figura 3.2. El que las TCE del cultivo sean bajas significa que el crecimiento de los peces fue lento, implicando por lo tanto un metabolismo menor, un mayor tiempo de cultivo y por lo tanto más recursos para el cuidado del cultivo. Una de las principales causas para que el crecimiento de un cultivo de truchas arco iris como lo indica Blanco (1994), son las bajas temperaturas de la zona de cultivo, ya que los peces tienen la capacidad de disminuir su respiración y por lo tanto disminuye también su metabolismo a bajas temperaturas.

Cuadro 3.1. Curvas de crecimiento de cultivo de truchas arco iris.



Una consecuencia de la disminución del metabolismo es el aumento del factor de conversión alimenticia (FCA). El factor de conversión alimenticia indica la cantidad en gramos de alimento que se debe suministrar a un pez para que aumente en un gramo su masa corporal. Debido a que los peces disminuyen su metabolismo a bajas temperaturas, estos solo asimilan el alimento necesario para mantener sus funciones vitales. De esta manera el alimento que no se necesita es eliminado y no se asimila.

Debido a lo expuesto anteriormente los FCA calculados en el cultivo (Tabla 3.2.) son relativamente altos comparados con datos de la piscifactoría de Pailones del IASA, donde se ha calculado un FCA de 0,95 g alimento/g trucha. Los FCA calculados en el cultivo demuestran que solo entre el 30 % y 34 % del alimento ingerido por el animal fue asimilado en su organismo. Valores altos de FCA significan desperdicio de alimento ya que aproximadamente el 60 % del alimento proporcionado no es aprovechado por el animal. Además de las bajas temperaturas, otra causa para que los valores de FCA sean altos, es que la alimentación a los animales de cultivo se la realizó a voluntad, de manera que las truchas ingirieron más alimento del que pueden procesar con un metabolismo bajo (Blanco, 1994).

La condición de los peces al finalizar el cultivo fue buena. Sin embargo, se pudo observar algunos animales con un crecimiento muy deficiente. Por causa de estos

animales los índices de condición fueron relativamente bajos (Tabla 3.2.) comparados con valores proporcionados en la piscifactoría de Pailones del IASA, donde se reportó un índice de condición de 1,5. Sin embargo, existe una diferencia de alrededor del 30 % entre los datos proporcionados en las piscinas de Pailones y los datos obtenidos durante el cultivo del presente trabajo, lo que sugiere que las condiciones de cultivo y el cambio de alimentación afectaron significativamente a la condición corporal de los animales.

3.3. Concentraciones de arsénico en balanceados de alimentación.

La recomendación del personal de las piscinas piscícolas de Pailones del IASA, fue proporcionar a los animales balanceados que contengan 40 % de proteína, ya que se encuentran a una etapa de crecimiento y de mayor asimilación proteica. En el mercado existen algunas marcas comerciales de balanceados para truchas, sin embargo se escogió la marca Piscis debido a que fue la única que se pudo conseguir en almacenes agrícolas de la ciudad de Sangolquí, para venta minorista.

La determinación de las concentraciones de arsénico en los balanceados utilizados en la alimentación es importante, para calcular la cantidad de arsénico proporcionada a cada animal en la ingesta.

Tabla 3.3. Concentraciones de arsénico en muestra seca de balanceados utilizados en el cultivo de truchas arco iris.

Balaceado	As peso seco (mg/kg)	As peso húmedo (mg/kg)
B1	1,98	1,74
B2	2,72	2,39
B3	2,64	2,32
Media	2,45	2,15
SD	0,41	0,35

En la Tabla 3.3. se observa que las concentraciones de arsénico en los balanceados utilizados, se encuentran alrededor de $2,45 \pm 0,41$ mg/kg en peso seco. Aunque en el Ecuador no existe una normativa que establezca una concentración máxima permitida para balanceados de uso en acuicultura, la FAO en su “Manual para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos”, propone una concentración máxima de

arsénico de 10 mg/kg en derivados de pescados y otros animales marinos que tienen hasta 12 % de humedad (Olvera, 1993). La materia prima principal para la elaboración de balanceados para consumo de truchas es la harina de pescado y según la información proporcionada en el empaque de los balanceados, estos poseen una humedad de 12 %, por lo que estos estarían dentro de los límites propuestos por la FAO.

La harina de pescado es elaborada a partir de peces de poca importancia comercial y productiva capturados en producciones atuneras y/o sardineras y también de desechos de pescados producidos durante el procesamiento de los mismos (vísceras, cabezas, escamas y piel). Suñer (2002), reportó concentraciones de arsénico total en peces del mar (atún, sardinas, anchoas, albacora y otros) entre 0,6 y 32 mg/kg en muestra seca. Por esta razón la fuente más probable, que aporta arsénico a los balanceados para alimentación de truchas es la harina de pescado, la cual está elaborada a partir de materias primas que contienen importantes contenidos de arsénico.

Para el cálculo de la cantidad de arsénico aportada por la ingesta de balanceado durante el cultivo de truchas arco iris y de acuerdo a la discusión sobre los FCA en la sección anterior, se asume que el alimento total asimilado corresponde únicamente al peso medio ganado por animal durante el cultivo, ya que su única fuente de alimentación fue el balanceado proporcionado diariamente. Utilizando la concentración media de arsénico en peso húmedo (Tabla 3.3.) y el peso medio ganado de todo el cultivo (Tabla 3.2.), se calcula que durante el cultivo la ganancia en arsénico fue 0,383 mg de los cuales, según los FCA cuantificados anteriormente, aproximadamente solo 0,127 mg fue asimilado por cada animal.

3.4. Acerca de los métodos de detección de arsénico y arsenobetaina.

Durante cada lote de digestiones de las muestras para determinar arsénico total, se corrió un blanco que fue procesado de igual manera a cada muestra. El blanco consistió en la preparación una muestra sin tejidos de trucha. La lectura de las soluciones obtenidas de los blancos no entregó valores de lectura de arsénico. Por lo tanto se comprueba que no hubo contaminación por arsénico durante las digestiones y la lectura en la determinación de arsénico total en muestras de músculo de pez, balanceados y muestras de agua. Ya que no hubo contaminación en las digestiones, se

comprueba que el tratamiento de las muestras se realizó de la manera más adecuada y que por lo tanto no se necesita realizar ninguna corrección en los datos obtenidos en los análisis de arsénico.

Con respecto a la detección de arsenobetaina en GC-FID, durante la corrida del estándar y de las muestras, se encontraron cuatro picos asociados con la detección de arsenobetaina. Los tiempos de retención de los picos encontrados fueron a los 5,39 minutos; 5,68 minutos; 6,12 minutos y 6,43 minutos. A fin de comprobar la proporcionalidad de la detección, se compararon los cromatogramas del solvente en el que se encontraban las muestras con los cromatogramas del solvente más el estándar de arsenobetaina. El cálculo de concentraciones se lo realizó sumando las áreas bajo los cuatro picos generados por las muestras y se correlacionó con la suma de las áreas de los picos del estándar de arsenobetaina.

Como se observa en el Anexo 4, los picos detectados se generaron posteriores al pico del solvente. La forma irregular de los picos se debe a que las concentraciones de arsenobetaina en las muestras eran muy bajas por lo que los picos fueron muy pequeños y de forma irregular. Estos factores determinaron que cuando existió un pequeño desequilibrio en la preparación del solvente metanol:agua (1:1) los picos de arsenobetaina se deformaran inmediatamente, produciendo picos con valores erróneos de áreas. Por esta razón, después de validar visualmente cada uno de los cromatogramas obtenidos, se seleccionaron solo dieciséis de las 60 muestras leídas. Las muestras seleccionadas fueron las siguientes: 108, 110, 116, 117, 118, 121, 124, 125, 202, 209, 211, 214, 217, 221, 223 y 227. Además también se validó y seleccionó la muestra correspondiente a la siembra de animales, antes del cultivo. Notar que se aprobaron los cromatogramas en los que los picos correspondientes a la arsenobetaina fueron independientes del pico del solvente.

Con respecto al análisis de las muestras en GC-MS, se detectó un pico a los 4,3 minutos con mejor resolución que los picos detectados en GC-FID. A diferencia de del GC-FID el GC-MS tiene una mayor sensibilidad, porque puede detectar sustancias en niveles de partes por billón. Adicional a esto, la detección en masas presenta la ventaja de detectar directamente a la molécula por su peso molecular, lo que conlleva tener una gran sensibilidad en la detección y buena resolución de pico.

De esta forma solo el 26,6 % de las muestras pudieron ser leídas en GC-FID y presentaron resultados favorables para la investigación. Con respecto a la detección en GC-MS de las 11 muestras leídas se tuvieron que descartar los resultados de las muestras 111, 123 y siembra debido a que por sobreposición de picos no se pudo analizar el área real de los picos y por lo tanto equipo proporcionó valores de lectura muy pequeños. Es de recalcar que la detección en GC-MS obtuvo mejor rendimiento en el análisis ya que el 27,27 % de las muestras presentaron resultados válidos para la investigación, sin embargo la diferencia no es significativa con respecto al porcentaje de lectura que se obtuvo en GC-FID.

Respecto a la detección de arsenobetaina en alimentos, no se existe información acerca de estudios similares ni de metodologías utilizadas en el ámbito nacional. En el ámbito internacional la mayoría de metodologías utilizan HPLC-ICP-MS para la especiación de compuestos arsenicales en aguas, peces, humanos y otras fuentes de muestras (Suñer et al., 2002; Montoro, 2006). Sin embargo, el presente proyecto no plantea una especiación completa de compuestos arsenicales, ya que la meta propuesta fue detectar y cuantificar arsenobetaina, lo cual fue logrado exitosamente. Se utilizó cromatografía de gases independientemente de la detección utilizada, basándose en el hecho de que la arsenobetaina es un compuesto orgánico con una composición estérica que le confiere la propiedad de volatilizarse.

3.5. Concentraciones de arsénico y arsenobetaina en muestras de músculo de trucha.

Se determinó que la concentración de arsénico total en base seca fue de alrededor de $5,12 \pm 0,99$ mg/kg y no existió diferencia significativa entre las muestras de la piscina 1 y la piscina 2. Se puede observar en la tabla 3.4., que las concentraciones de arsénico aumentaron significativamente después de los 61 días de cultivo en aguas del río Tambo afluente principal de la laguna Papallacta. El aumento de las concentraciones medias de arsénico total fue de aproximadamente 2,01 mg/kg en peso seco y de 0,52 mg/kg en peso húmedo.

Tomando en cuenta los pesos medios de los animales sin vísceras al final del cultivo (Tabla 3.2.) y la diferencia entre la concentración inicial y final de arsénico en los peces se calculó la cantidad de arsénico acumulado durante el cultivo, la cual fue de aproximadamente 0,060 mg por trucha (Tabla 3.4). Se utilizaron para este cálculo los pesos de los animales desviscerados debido a que las concentraciones fueron determinadas en músculos del pez los cuales son el componente mayoritario de un cuerpo desviscerado.

Tabla 3.4. Concentraciones medias de arsénico en muestra seca y muestra húmeda, valores de humedad y cantidad de arsénico acumulado en truchas arco iris durante cultivo.

Parámetro	Piscina 1	Piscina 2	Total	Siembra
Humedad (%)	75,69	74,68	75,185	75,81
As Total muestra seca (mg/Kg)	5,29 ± 0,89	4,95 ± 1,08	5,12 ± 0,99	3,11 ± 0,12
As Total muestra húmeda (mg/kg)	1,29 ± 0,22	1,25 ± 0,27	1,27 ± 0,25	0,75 ± 0,03
Diferencia entre concentración inicial y final de Arsénico peso húmedo (mg/kg)	0,54	0,50	0,52	-----
Arsénico acumulado por trucha durante el cultivo (mg)	0,064	0,056	0,060	-----

Es necesario relacionar estos datos de acumulación, con el aporte de arsénico proporcionado por los balanceados y el agua de cultivo. El aporte de arsénico proveniente de los balanceados fue calculado en la sección 3.3. y corresponde a 0,127 mg durante todo el cultivo y el del agua fue calculado tomando en cuenta el porcentaje de humedad del animal (75,81 %) y el peso ganado durante el cultivo, de manera que si el peso medio ganado durante el cultivo fue de 58, 85 gr, el agua necesaria para esta ganancia fue de 44,61gr, con una concentración media de 150 µg/L el aporte de arsénico fue de aproximadamente 0,007 mg.

Por otro lado tomando los datos de la tabla 3.4., la cantidad de arsénico acumulada resultado del análisis de valores de concentración de arsénico inicial y final en los peces fue de 0,060 mg, aproximadamente. Este valor es calculado tomando en cuenta únicamente los músculos del pez. De esta forma se puede afirmar que de los 0,127 mg aportados en la alimentación y de los 0,007 mg aportados por el agua, durante el cultivo, solo 0,060 mg se acumuló en los músculos de cada una de las truchas, es decir, solo un 45 % de la ingesta de arsénico se acumuló en los músculos de los peces durante el cultivo de 61 días.

En el análisis anterior no se toma en cuenta el arsénico aportado por la difusión a través de la piel y la respiración. A pesar de que se ha reportado que el arsénico puede ser absorbido en peces por vía cutánea, por el tracto digestivo y por la respiración (Tamaki & Frankenberger, 1992), la cantidad absorbida es muy pequeña por lo que se desprecian estos valores. Aunque se han reportado concentraciones de arsénico importantes en la piel y las agallas de los peces (Maher et al., 1999), trabajos recientes han demostrado que la piel es una puerta poco probable para la absorción de arsénico hacia el organismo interno, debido a que el arsénico soluble queda retenido en las secreciones mucosas de la piel de los peces (Báez et al., 2004). Con respecto a la respiración ocurre algo similar a lo de la piel, donde el arsénico queda retenido en las superficies mucosas de las agallas sin demostrarse aun el paso hacia el organismo interno aunque se sostiene que, si el arsénico se encuentra en estado libre, es posible el ingreso directo hacia el sistema circulatorio del animal (Báez et al., 2004). En el presente trabajo se asume que la principal vía de absorción de arsénico es la ingestión de agua y alimento.

Es de notar que el arsénico aportado por la ingesta de los balanceados y del agua de cultivo, fue mayor que el arsénico acumulado en los músculos. De estos resultados, se puede sugerir que el arsénico que no se acumuló en los músculos, fue acumulado en otras estructuras y órganos del animal (riñón, hígado, agallas, piel y escamas). Además existe la posibilidad que parte del arsénico ingerido, haya sido eliminado por vía de las secreciones de la piel y por la excreción del riñón (Báez et al., 2004).

Las concentraciones de arsenobetaina determinadas en GC-FID y GC-MS fueron similares. Sin embargo la desviación estándar en los resultados obtenidos con GC-MS

fue mucho mayor que la desviación estándar obtenida con GC-FID (Tabla 3.5.). Esto se debe a que el número de muestras analizadas en GC-MS fue menor y por lo tanto cualquier variación en un valor tiene una significativa repercusión en el resultado final.

Las concentraciones de arsenobetaina en peces que han sido reportadas son muy variadas en concentraciones que van desde 0,38 mg/kg hasta 187,3 mg/kg (Suñer et al., 2005; Tamaki & Frankenberger, 1992). Sin embargo, la importancia de cuantificar la arsenobetaina, radica en estimar el porcentaje de su contribución con respecto al arsénico total de la muestra y de esta manera cuantificar el arsénico inorgánico tóxico y el arsénico orgánico no tóxico que existe en la muestra.

De los resultados obtenidos, se determinó que el arsénico aportado por la arsenobetaina corresponde aproximadamente al 76 % en relación al arsénico total de la muestra, tanto en animales de la siembra como animales al término del cultivo. Trabajos realizados en peces, en otros países, reportan que el porcentaje de arsénico que aporta la arsenobetaina en relación al arsénico total está entre 30 % y 50 % (Suñer et al., 2005) y otros trabajos reportan porcentaje más altos entre 82 % y 90% (Tamaki & Frankenberger, 1992). Sin embargo los autores de estos estudios enfatizan, que la variabilidad de los porcentajes de arsénico orgánico obtenidos en sus investigaciones, está afectada por factores ambientales y tipo de especies de animales.

Tabla 3.5. Parámetros determinados en análisis con GC-FID y GC-MS.

Parámetro	Siembra	Final de cultivo	
	GC-FID	GC-FID	GC-MS
Arsenobetaina (mg/Kg)	5,68	9,26 ± 2,23	9,36 ± 5,11
As como AsBet (mg/Kg)	2,39	3,90 ± 0,94	3,94 ± 2,15
As Inorgánico (mg/Kg)	0,72	1,20 ± 0,62	1,84 ± 1,45
As Orgánico (%)	76,80	76,21 ± 11,44	76,22 ± 19,30
As Inorgánico (%)	23,20	23,79 ± 11,44	23,78 ± 19,30

En el presente trabajo se encontró porcentajes similares en animales de siembra como en animales al final del cultivo. Esto es un indicador que el cambio de condiciones ambientales, calidad de agua y condiciones de cultivo no afectó al

metabolismo del arsénico dentro del organismo de los peces. El porcentaje de 76 % de arsénico orgánico con respecto al arsénico total puede estar dado por la línea genética de la especie utilizada en el cultivo, ya que no existió variaciones en porcentaje debido a otros factores. El valor de 76 % no es tan alto como los valores encontrados por Tamaki & Frankenberger (1992) ni tan bajos como los de Suñer (2005).

A pesar de la línea genética, el metabolismo de los peces es adaptable a las condiciones ambientales y a otras condiciones fijadas en este trabajo como por ejemplo: gran altura y bajas temperaturas. Las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo del animal por lo que las reacciones de las rutas metabólicas disminuyen de velocidad. La disminución de la velocidad de las rutas metabólicas conlleva a una disminución de la capacidad de metabolizar el arsénico dentro del organismo del pez. A causa de esto la capacidad de metilación del arsénico por parte del animal disminuye ya que las reacciones son más lentas y el arsénico inorgánico ingerido que no puede ser metabolizado sigue circulando por vasos sanguíneos hasta lograr ser metabolizado o excretado. Es de notar que el mecanismo de excreción de los peces tiene la particularidad de no poseer glomérulos en los nefrones de los riñones, lo que provoca que la eliminación de metabolitos finales y sustancias tóxicas se produzca por transporte activo (Piasano, 1994). Además, al encontrarse en un medio hipotónico los peces tienden a acumular sales para mantener la homeostasis dentro de su organismo ya que son osmoreguladores (Pisano, 1994).

Debido a estas situaciones la excreción de sustancias tóxicas en los animales fue lenta lo que provocó que al tomar las muestras de músculo, además del arsénico acumulado en la estructura, también se determine el arsénico inorgánico que se encuentra presente en los vasos sanguíneos. De esta forma, se encontró que la proporción de arsénico inorgánico fue ligeramente mayor que las encontradas en otros trabajos. Es así que, la línea genética de los animales y principalmente, los factores ambientales influyeron para que los resultados varíen ligeramente de los resultados reportados por Suñer (2005) en España y Tamaki & Frankenberger (1992) en Japón y Australia.

Tanto en las piscinas de Pailones del IASA como en las piscinas de Jamanco en papallacta existen condiciones de baja temperatura y altura elevada, por lo que los

porcentajes de arsénico aportado por la arsenobetaina son similares en truchas de siembra como en truchas de cosecha.

3.6. Consumo de truchas arco iris cultivadas en aguas del río Tambo.

Los profesionales dedicados al estudio de la Nutrición y las Ciencias de la Salud recomiendan alternar el consumo de pescado con otras fuentes proteicas de origen animal (carne, huevos y lácteos) o vegetal (legumbres, cereales y frutos secos) para que la dieta sea equilibrada. En concreto, se considera que la ración de consumo de pescado por persona debe ser de 125 g a 150 g sin desperdicios, y la frecuencia de consumo recomendable, entre 3 y 4 veces por semana.

No existen datos estadísticos realizados por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos a cerca de la canasta alimenticia que se consume en la zona de la laguna de Papallacta. Sin embargo es de conocimiento popular que la zona de la laguna de Papallacta es conocida por la preparación de platos gastronómicos en la que se utiliza la trucha como plato principal. En un sondeo que se realizó durante las visitas de campo en restaurantes y habitantes de la zona se determinó que la porción de truchas que llevan estos platos está entre los 250 g y 300 g. Incluso en la zona se llagan a vender truchas de hasta 500 g de peso.

La ingesta máxima de arsénico inorgánico recomendada por la Organización Mundial de la Salud (WHO) es de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa corporal/semana. Para una persona promedio de 65 kg de masa corporal el límite de consumo de arsénico por semana sería de 975 μg . Al consumir una porción de 300 gr de trucha, tomando en cuenta las concentraciones de arsénico total en muestra húmeda, obtenidas en el presente trabajo (Tabla 3.2.) se ingerirían alrededor de 381 μg de arsénico. De estos 381 μg el 23,79 % sería arsénico inorgánico, es decir 90,64 μg pueden ser considerados tóxicos. Los restantes 290,36 μg sería arsénico aportado por arsenobetaina, la cual es considerada no tóxica. Tres porciones a la semana aportarían 271,92 μg .

De acuerdo a este análisis una persona podría ingerir una porción de trucha sin peligro alguno, e incluso podría llegar a ingerir hasta 3,22 kg de trucha para que la ingesta de arsénico esté dentro de las recomendaciones de la WHO. Sin embargo,

debido a la contaminación generalizada de la zona por arsénico, se debe ser muy cuidadosos en determinar los aportes del agua y otros alimentos que pueden contener arsénico a fin de calcular la ingesta semanal de los habitantes de la zona y compararla con la propuesta por la WHO.

CAPITULO 4: CONCLUSIONES.

- El agua del río Tambo, afluente principal de la laguna de Papallacta, cumple con casi todos los requerimientos para ser utilizada en cultivo de Truchas Arco Iris; sin embargo, no puede ser utilizada para esta actividad ya que la concentración de arsénico media de 150 µg/L, sobrepasa el límite máximo permitido de 50 µg/L establecido en el TULAS en su Libro VI, anexo 1, tabla 3.
- Se determinó que el cultivo de truchas en las piscinas de producción piscícola de la Comuna Jamanco es factible ya que la mortalidad de los animales de 2,43 % fue baja; sin embargo las bajas temperaturas de la zona producen un crecimiento lento de los animales implicando mayores recursos y tiempo para obtener peces en “pan size”.
- Se encontró que los balanceados de marca Piscis con 40 % de proteína, utilizados en el presente trabajo, contienen cantidades importantes de arsénico ($2,45 \pm 0,41$ mg/Kg) y que éstos son, por lo tanto, una de las fuentes principales de aporte del químico, que por el metabolismo propio de las truchas se acumula en sus tejidos y estructuras.
- Se determinó que como resultado del cultivo de truchas en aguas contaminadas con arsénico del río Tambo y del suministro del alimento conteniendo arsénico, existió acumulación del metaloide en el tejido muscular de los animales, aproximadamente en 0,52 mg As /Kg de tejido, en un periodo de 61 días de cultivo; lo cual fue comprobado al comparar concentraciones de arsénico en muestras de animales antes del cultivo y animales después del cultivo.
- Se comprobó que aproximadamente el 76 % del arsénico total acumulado ($5,12 \pm 0,99$) en músculos de truchas arco iris corresponde a arsenobetaina y que esta

proporción es casi constante antes y después del cultivo. De igual forma se determinó que este porcentaje es similar a otros resultados reportados por investigadores de otros países y que su pequeña variación se debe principalmente a las condiciones ambientales del cultivo, especialmente a la baja temperatura, y a la línea genética de los animales utilizados.

- Se estableció que la cromatografía de gases, independientemente del tipo de detección, no es el método más adecuado para determinar y cuantificar arsenobetaina en muestras de músculos de trucha debido a las interferencias producidas por el solvente utilizado y la gran cantidad de compuestos organovolátiles que se extraen con la técnica utilizada.
- Se observó que la detección de arsenobetaina en el espectrómetro de masas presenta cromatogramas con mejor resolución que los cromatogramas obtenidos con detección con ionización en llama debido a poca concentración de arsenobetaina en los extractos de las muestras.
- Se determinó que el consumo de truchas arco iris cultivadas con aguas del río Tambo, no causaría afectaciones a la salud de los humanos ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la ingesta de arsénico tóxico que proporciona una porción de 300 g es de 381 μg de los cuales solo el 23 % es nocivo para la salud, es decir 90,64 μg . La Organización Mundial de la Salud recomienda que la ingesta máxima de arsénico sea de 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal/ semana, lo que para una persona de 65 Kg de peso corresponde a 975 μg de arsénico por semana. Es así que se podría llegar a consumir hasta 3,22 kg de trucha a la semana sin peligro alguno. Sin embargo, debido a la contaminación generalizada de la zona por arsénico, se debe ser muy cuidadosos en determinar los aportes del agua y otros alimentos que pueden contener arsénico a fin de calcular la ingesta semanal de los habitantes de la zona y compararla con la propuesta por la WHO.

CAPITULO 5: RECOMENDACIONES.

- Se recomienda que en las instalaciones de producción piscícola de la Comuna Jamanco se implante un sistema de remoción de arsénico para que el agua del río

Tambo cumpla con los requisitos de la Normativa Ambiental Ecuatoriana y sea, por lo tanto, utilizable para la actividad acuícola. De los diversos sistemas de remoción de arsénico que existen, se recomienda la utilización de sorbentes desarrollados en el Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército, los están siendo sintetizados para la remoción selectiva del arsénico en aguas de la zona de Papallacta.

- Se recomienda también utilizar las aguas de las vertientes libres de arsénico, aledañas al canal que transporta el agua desde el río Tambo hacia las piscinas de producción piscícola de Jamanco, para reducir de esta manera las concentraciones de arsénico en las piscinas de cultivo.
- Para reducir la ingesta de arsénico en truchas cultivadas en aguas contaminadas con arsénico y en cualquier cultivo de truchas en general, se recomienda administrar alimentos con menor cantidad de arsénico, elaborados a partir de fuentes alternativas que aporten en menos cantidad el metaloide. Por ejemplo, se recomienda utilizar alimentos balanceados como los desarrollados en el IASA, los cuales han sido elaborados a partir de amaranto y quinua, materias primas que aportan menos arsénico que la harina de pescado, utilizada tradicionalmente para la elaboración de estos balanceados.
- En las piscinas utilizadas para el cultivo es recomendable cambiar el diseño del sistema de entrada y salida de agua para evitar la formación de puntos muertos y remolinos. Es así que se recomienda que la entrada de agua se la adapte para que se administre el agua por la mayor cantidad de superficie y que la salida de agua se la realice fuera de la piscina con sifón a nivel del límite máximo de agua en la piscina. (Anexo 6). De esta manera se obtendrá un mejor flujo de agua.
- Es aconsejable que se realicen estudios similares al presente trabajo con aguas libres de arsénico y/o balanceados libres de arsénico para calcular los aportes reales del metaloide que proporcionan la alimentación y el agua de cultivo y de esta manera comprender mejor la fisiología y metabolismo de la trucha frente a la ingesta de arsénico. De igual manera es importante realizar estos estudios en las diversas

estructuras y órganos de los animales para obtener datos completos de la acumulación total.

- Es importante realizar una evaluación de la acumulación de arsénico en los animales, a lo largo de un cultivo completo de truchas arco iris en aguas del río Tambo, para obtener información más detallada acerca de la cinética de acumulación durante todo un lote de producción y en las diferentes fases de crecimiento.

- Para determinar concluyentemente que las truchas cultivadas en aguas del río Tambo, contaminadas con arsénico, son aptas para el consumo humano, es necesario realizar investigaciones en similares y diferentes condiciones a las del presente trabajo, con equipos que discriminen mejor las especies arsenicales orgánicas e inorgánicas, tengan mayor sensibilidad y posean un mejor sistema de detección (HPLC-ICP-MS) a fin de comparar resultados. De igual manera es importante realizar una evaluación de la ingesta de arsénico proporcionado por los diferentes alimentos y agua de la zona de Papallacta, a las personas que los consumen.

CAPITULO 7: BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abernathy C. (2001). Arsenic: Exposure and Health Effects. Office of Water, Office of Science and Technology, Health and Ecological Criteria Division United States Environmental Protection Agency. Estados Unidos.

2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2005). Toxicological profile for Arsenic. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

3. Alvarado H. & Bastardo H. (1983). Producción de Truchas en Venezuela. Fonaiap Divulga No. 9: 5–11.

4. Apostoli P., Bartoli D., Alessio L. & Buchet J.P. (1999). Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic. *Occup Environ Med*, 56: 825–832.

5. Báez O., García F. & Galán C. (2004). Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). Ensayos en cortos plazos. *AcuaTIC* No. 21: 62-70.
6. Barra M., Erthal S., João J. & De la Guardia M. (2000). Especificação de arsênio – uma revisão. *Quimica Nova*, 23(1): 58–70.
7. Blanco M.C. (1994). *La Trucha. Cría Industrial*. Ediciones Mundi-Prensa. España.
8. Bigler J. (2004). *Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Volume 1: Fish Sampling and Análisis*. Office of Science and Technology, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency. Estados Unidos.
9. Corporación de Estudios y Publicaciones. (2002). *Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria: Libro VI, Anexo1; Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua*. Ministerio de Medio Ambiente del Ecuador. Ecuador.
10. Cumbal L., Aguirre V., Murgueitio E., Tipán I. & Chávez C. (2006). The origin of arsenic in waters and sediments from Papallacta Lagoon. *Libro de resúmenes. Taller de distribución de As en Iberoamérica.*: 85–86.
11. Fernández P. (1996). Determinación del tamaño muestral. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. CAD ATEN PRIMARIA* No. 3: 138-14.
12. Foa V., Colombi M., Maroni M. & Buratti M.. (1987). *Indicadores biológicos para la valoración de la exposición humana a compuestos químicos industriales. Comisiones de las Comunidades Europeas. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. Luxemburgo.*
13. Francesconia A. & Edmonds J. (1998). *Arsenic Species in Marine Samples. Croatica Chemica Acta Ccaca*, 71(2): 343-359.

14. García A. & Calvario O. (2003). Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Trucha para la Inocuidad Alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. México.
15. Greeberg A., Clesceri L. & Eaton A. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA. Estados Unidos.
16. Gunnar N.(2002). Enciclopedia de la Salud y Seguridad en el Trabajo. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Estados Unidos.
17. Henry T. (2003). Technical Summary of Information Available on the Bioaccumulation of Arsenic in Aquatic Organisms. Office of Science and Technology Office of Water U.S. Environmental Protection Agency. Estados Unidos.
18. Heredia E. & Bernal C. (2003). Distribución de contaminantes producto del derrame de petróleo del 8 de abril de 2003 en la laguna de Papallacta. ECUAVITAL. Ecuador.
19. Hirata S., Toshimitsu H. & Aihara M. (2006). Determination of Arsenic Species in Marine Samples HPLC-ICP-MS. Analytical Sciences, 22: 39-43.
20. Howard A.G. & Comber S.D.W. (1992). Hydride-Trapping Techniques for the Speciation of Arsenic. Mikrochim Acta 109: 27-33.
21. Irwin R., Van Mouwerik M., Dubler M. & Basham W. (1997). Environmental contaminants Enciclopedia. Arsenic Entry. Nacional Park Service. Water resources divitions, water operations branch. Estados Unidos.
22. Jover M., Martínez S., Tomás A. & Pérez L. (2003). Propuesta metodológica para el diseño de instalaciones piscícolas. Revista AquaTIC, 19: 17-26.

23. Julshamn K. (2000). ARSENIC. Determination in seafood by electrothermal atomic adsorption spectrometry (ET AAS) after microwave digestion. Nordic committee on food analysis. No. 166, 2000.
24. Kumaresan M. & Riyazuddin, P. (2001). Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current Science*, Vol. 80, 7: 837–846.
25. Maher W., Goessler W., Kirby J. & Raber G. (1999). Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of sea mullet (*Mugil cephalus*) from Lake Macquarie NSW, Australia. *Studies in chemical oceanography: a collection of papers dedicated to Professor J. Dennis Burton in honour of his contributions to Marine Chemistry 1999*, vol. 68, nº 1-2: 169-182.
26. Mandal B., Ogra Y., Anzai K. & Suzukib K. (2004). Speciation of arsenic in biological samples. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198: 307-318.
27. Martínez S., Tomás A., Pérez L. & Jover M. (2003). Alternativas de diseño de una granja de truchas: volumen de producción y número de lotes anuales con dos perfiles de temperaturas. *Revista AquaTIC*, nº 19: 35 – 40.
28. Milstein L., Essader A., Pellizzari E., Reshan F., Raymer J. & Levine K. et al. (2003). Development and Application of a Robust Speciation Method for Determination of Six Arsenic Compounds Present in Human Urine. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 111, No. 3: 293–296.
29. Montoro R. (2003). Métodos de cuantificación de arsénico total y arsénico inorgánico en muestras de productos de la pesca. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Laboratorio de Contaminación Metálica. España.
30. Montoro R. (2006). Protocolo para la determinación de Arsénico Inorgánico En Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Laboratorio de Contaminación Metálica. España.

31. Morita M. & Edmons J.S. (1992). Determination of Arsenic species in environmental and biological samples. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 64, No. 4: 575–590.
32. Muñoz O., Vélez D. & Montoro R. (1999). Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(iii) + As(v)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 124: 601–607.
33. Niedzielski P. & Siepak M. (2003). Analytical Methods for Determining Arsenic, Antimony and Selenium in Environmental Samples. *Polish journal of Environmental Studies* Vol. 12, No. 6: 653–667.
34. OEA. (1987). Comisión Mixta de Cooperación Amazónica - Ecuatoriano – Colombiana Plan de Ordenamiento y Manejo de las Cuencas de los Ríos San Miguel y Putumayo. Secretaria Ejecutiva Para Asuntos Económicos y Sociales. Estados Unidos.
35. Olvera M., Martínez C. & Real E. (1993). Manual de Técnicas para Laboratorio de nutrición de Peces y Crustáceos. Departamento de pesca de la FAO.
36. Ortiz J., Falconí R., Luna M., Sala F. & Cumbal, L. (2005). Evaluación y Validación de Amaranto (*Amaranthus Caudalus*) y Quinoa (*Chenopodium Quinoa*) como reemplazantes de harina de pescado en dietas para crecimiento de Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus Mykiss*). *Ciencia*, Vol 8, No.2: 63–70.
37. Pradosh R., Anupama S. (2002). Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Current Science*, Vol. 82, No. 1: 38–45.
38. Pellizari E. & Clayton A. (2006). Assessing the Measurement Precision of Various Arsenic Forms and Arsenic Exposure in the National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS). *Environmental Health Perspectives*, Vol. 114, No. 2: 220–227.

39. Pisano A. & Barbieri. (1994). *Anatomía Comparada de los Vertebrados*. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Argentina.
40. Pizarro I., Gómez M., Cámara C. & Palacios M.A. (2003). Arsenic speciation in environmental and biological samples. Extraction and stability studies. *Analytica Chimica Acta* 495: 85–98.
41. Sanz-Mendel A. (1998). Toxic trace metal speciation: importance and tools for environmental and biological analysis. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 70, No. 12: 2281-2285.
42. Suñer M., Devesa V., Muñoz O., Vélez D. & Montoro R. (2001). Application of column switching in high-performance liquid chromatography with on-line thermo-oxidation and detection by HG-AAS and HG-AFS for the analysis of organoarsenical species in seafood samples. *J. Anal. At. Spectrom.*, 16: 390–397.
43. Suñer M., Devesa V. Clemente M.J., Vélez D., Montoro R. & Surieta I. et al. (2002). Organoarsenical Species Contents in Fresh and Processed Seafood Products. *J. Agric. Food Chem.* 50: 924-932.
44. Svobodova Z., Elechovska O., Machova J. & Randak T. (2002). Content of Arsenic in Market-Ready Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. Brno*, 71: 361–367.
45. Tamaki S. & Frankenberger W.T. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 124: 79-110.
46. Templeton D., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L., Muntau, H. & Van Leeuwen H. et al. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 72, No. 8: 1453-1470.
47. Torralba M. (1996). Mejoras al sistema de generación de hidruros-absorción atómica para la determinación de arsénico total en materiales biológicos.

Determinación simultánea de sus especies tóxicas mediante procedimientos de calibración multivariante. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. España.

48. Weemaels N. (2003). Derrame SOTE en Papallacta. Acción ecológica. Ecuador.
49. Wei X., Brockhoff-Schwegel C. & Creed J. (2000). Application of sample pre-oxidation of arsenite in human urine prior to speciation via on-line photo-oxidation with membrane hydride generation and ICP-MS detection. *Analyst*, 125: 1215–1220.
50. WHO. (2001) Arsenic and arsenic compounds. Environmental Health Criteria. (Second edition). Geneva, World Health Organization. Estados Unidos.