

ESTUDIO DE LA TOXICIDAD ASOCIADA AL VERTIMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CON PRESENCIA DE COLORANTES Y PIGMENTOS EN EL ÁREA METROPOLITANA DEL VALLE DE ABURRÁ

✉ LEONARDO FABIO BARRIOS ZIOLO¹

LUISA FERNANDA GAVIRIA RESTREPO²

EDISON ALEXÁNDER AGUDELO³

SANTIAGO ALONSO CARDONA GALLO⁴

RESUMEN

Los colorantes y pigmentos están comenzando a ser considerados en el país como compuestos que pueden presentar características toxicológicas más allá de los aspectos estéticos en las aguas residuales. Esta investigación presenta los efectos ecotoxicológicos asociados a la capacidad que poseen las sustancias generadoras de color (colorantes y pigmentos) de inhibir la transmisión de la luz en el medio acuático, además de la toxicidad asociada a la molécula que las constituye. A partir de un diseño experimental se correlacionó el efecto de la concentración, contenido de sólidos totales y la longitud de onda de máxima absorción de diferentes colorantes sobre el organismo *Selenastrum Capricornutum*; los modelos de regresión obtenidos permitieron predecir en un 94 y 99% los efectos anteriormente mencionados. La toxicidad molecular fue evaluada utilizando la prueba de toxicidad de *Daphnia magna*. Finalmente se estudió la toxicidad de vertimientos de aguas residuales correspondientes a los principales sectores industriales del Área Metropolitana del Valle de Aburrá.

PALABRAS CLAVE: Colorantes; pigmentos; aguas residuales; pruebas de toxicidad; *Daphnia magna*; *Selenastrum capricornutum*; Análisis de varianza (ANOVA).

STUDY OF TOXICITY ASSOCIATED TO DUMPING OF WASTEWATER CONTAINING DYES AND PIGMENTS IN THE ABURRÁ VALLEY METROPOLITAN AREA

ABSTRACT

Dyes and pigments are beginning to be considered in this country as compounds that can present toxicological characteristics beyond esthetic aspects of wastewater. This paper presents the ecotoxicological effects associated with the capacity to inhibit light transmission in an aquatic medium with color generating substances (dyes and pigments), as well as

¹ Recursos Hidráulicos. Universidad Nacional de Colombia, Medellín - Colombia

² Biológica. Universidad Nacional de Colombia, Medellín - Colombia

³ Gestión y Medio Ambiente. Universidad Nacional de Colombia, Medellín - Colombia

⁴ Ingeniera Ambiental. Universidad Nacional de Colombia, Medellín - Colombia



Autor de correspondencia: Barrios-Ziolo, L.F. (Leonardo-Fabio): Carrera 80#65-223,M2-319, Medellín, Colombia
/ Tel: 4255120-3004817220
Correo electrónico: lfbarriosz@unal.edu.co

Historia del artículo:

Artículo recibido: 18-I-2016 / Aprobado: 29-XI-2016

Disponible online: 30 de febrero de 2017

Discusión abierta hasta abril de 2018



the toxicity associated the molecule that makes it up. From an experimental design a correlation was made of the effect of the concentration, total content of solids and maximum absorption wavelength of different dyes in the *Selenastrum Capricornutum* organism. The regression models obtained enabled predicting, in 94 and 99%, the aforementioned effects. Molecular toxicity was evaluated using the *Daphnia magna* toxicity test. Lastly, the toxicity of wastewater dumping corresponding to the leading industrial sectors of the Metropolitan Area of the Aburra Valley.

KEYWORDS: Dyes; Pigments; Wastewater; Toxicity tests; *Daphnia magna*; *Selenastrum capricornutum*; Analysis of variance (ANOVA).

ESTUDO DA TOXICIDADE ASSOCIADA AO VERTIMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS COM PRESENÇA DE CORANTES E PIGMENTOS NA ÁREA METROPOLITANA DO VALLE DEL ABURRÁ

RESUMO

Os corantes e pigmentos estão começando a ser considerado no país como compostos que possam ter características toxi- cológicas além dos aspectos estéticos nas águas residuais. Esta investigação apresenta os efeitos ecotoxicológicos associadas à capacidade que possuem as substâncias geradoras de cor (corantes e pigmentos), para inibir a transmissão de luz no meio aquático, além da toxicidade associada à molécula que as constitui. A partir de um desenho experimental se correlacionou o efeito da concentração, conteúdo de sólidos totais e o comprimento de onda de absorção máxima de diferentes corantes sobre o organismo *Selenastrum capricornutum*; modelos de regressão obtidos permitiram predizer em um 94 e 99% os efeitos anteriormente mencionados. A toxicidade Molecular foi avaliada usando o teste de toxicidade de *Daphnia magna*. Finalmente, estudo-se toxicidade de efluentes de águas residuais correspondentes aos principais sectores industriais da Região Metropolitana do Valle de Aburrá.

PALAVRAS-CHAVE: Corantes; Pigmentos; Águas residuais; Testes de toxicidade; *Daphnia Magna*; *Selenastrum capricornutum*; Análise de variância (ANOVA).

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la contaminación de los sistemas acuáticos es un fenómeno universal que afecta en gran medida a los países en desarrollo, como consecuencia del vertimiento de aguas residuales sin tratamientos o parcialmente tratadas. Entre las grandes preocupaciones que genera el vertimiento de aguas contaminadas sobre las fuentes hídricas, se resalta el hecho de que su toxicidad, además de los impactos estéticos negativos ocasionados frecuentemente por el vertimiento de colorantes y pigmentos, afecte, entre otros, organismos acuáticos, aquellos con la capacidad de realizar procesos fotosintéticos, los cuales constituyen la base de productores primarios que garantizan los flujos de energía

a niveles tróficos superiores (Sharma, 2007; Rand, 1995; Bae y Feeman, 2005; Verma, 2011).

A nivel local, las comunidades pertenecientes al Área Metropolitana del Valle de Aburrá, han evidenciado cómo los vertimientos constantes de aguas residuales de algunos sectores productivos, generan cambios en el color base del río Aburrá-Medellín, lo cual motivó al desarrollo de diferentes estudios que permitan avanzar en la determinación de los efectos reales que causan los colorantes y pigmentos sobre los ecosistemas acuáticos receptores. En consecuencia, se formula la presente investigación con el objetivo de conocer y analizar los diferentes tipos de toxicidad asociados al vertimiento de aguas residuales con presencia de colorantes y pigmentos sobre fuentes hídricas. Los resultados obtenidos permitieron

definir, además del grado de toxicidad de los vertimientos coloreados, el tipo de prueba o protocolo de toxicidad, considerado en la normatividad vigente de Colombia (Resolución 062 de 2007) más óptimo para la evaluación de estos efluentes.

La clasificación de los colorantes y pigmentos, puede realizarse utilizando como criterios: la constitución molecular o estructura química, el grado de solubilidad en un medio o solvente específico y, la forma de aplicación sobre un tipo de fibra objetivo o material de soporte. Esta última clasificación es adoptada por el sistema Índice de Color (*Colour Index*), el cual consta de un número de cinco dígitos correspondiente al nombre y color respectivo. El Índice de Color comprende los siguientes grupos de colorantes y pigmentos: ácidos, básicos, dispersos, directos, reactivos y baño (Gupta, 2009).

La clasificación anterior, fue considerada en el estudio de la ecotoxicidad de las aguas residuales con presencia de colorantes y pigmentos en la jurisdicción del Área Metropolitana del Valle de Aburrá, para lo cual se seleccionaron nueve sectores productivos relacionados con el uso de materias primas y vertimientos de aguas residuales con presencia de colorantes y pigmentos sobre el río Aburrá – Medellín, tales como: el sector textil, químicos, curtiembres, artes gráficas, tratamiento de aguas residuales, papel, cerámicos, metal mecánico, alimentos y bebidas. Las empresas participantes en el estudio, fueron seleccionadas inicialmente de acuerdo al ranking de las 500 empresas más grandes de Antioquia según la revista RAED de la Cámara de Comercio de Medellín (2011), definido de acuerdo al índice de participación de cada uno de los sectores productivos en las ventas netas reportadas, admitiendo que, a mayores ventas, se incrementa la actividad industrial, y por consiguiente, aumenta la generación de residuos líquidos. De los reportes de materias primas utilizadas por los sectores, y teniendo en cuenta la caracterización de las aguas residuales que vierten las empresas que los constituyen, se seleccionaron diez (10) de las sustancias (entre colorantes y pigmentos) más utilizadas en los procesos producti-

vos, de tal manera que abarcaran la totalidad del espectro visible en términos de longitudes de onda de máxima absorbancia, incluyendo los tonos blancos y negros; teniendo en cuenta lo anterior, se analizó la ecotoxicidad de los colorantes Índigo Carmín, Rojo 40, Amarillo N° 5, Sulfato Básico de Cromo, Óxido de Hierro Negro, Dióxido de Titanio, Óxido de Zinc, Rodamina β, Óxido de Cobre y Óxido de Hierro Rojo.

La ecotoxicidad acuática, es el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos adversos o tóxicos que producen las sustancias químicas, entre otros materiales xenobióticos, sobre los organismos acuáticos a diferentes niveles de organización, desde el nivel celular, pasando por organismos individuales, hasta las comunidades y el ecosistema en general. La toxicidad incluye efectos letales a corto y largo plazo, considerado además los efectos subletales representados por los cambios en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento. Es por tanto una propiedad relativa al potencial químico de la sustancia a la cual se exponen los organismos vivos; depende de la concentración, composición, propiedades químicas de la sustancias y del tiempo de exposición de los microorganismos.

Las pruebas de toxicidad son utilizadas para evaluar los efectos adversos de un compuesto químico sobre organismos vivos bajo condiciones estandarizadas y reproducibles, lo cual permite hacer comparaciones con otros compuestos químicos o especies evaluadas. Los efectos tóxicos agudos, se determinan en tiempos de exposición cortos, relativos al ciclo de vida del organismo expuesto; generalmente son severos o mortales y suelen expresarse en términos de la concentración letal media (CL50), valor que define la concentración a la cual se reduce en un 50% el número de organismos utilizados en la prueba de toxicidad durante un periodo entre 96 horas y 14 días. El efecto tóxico crónico, por su parte, está asociado a exposiciones frecuentes del organismo a una sustancia o grupos de sustancias específicos durante largos periodos de tiempo, en cuyo espacio pueden existir fases de latencia que dificultan la observación de los

efectos tóxicos. Estas fases dependen del tipo de organismos, de las características de la prueba de toxicidad aplicada y de las propiedades químicas de las sustancias involucradas; en consecuencia pueden inducir efectos letales (Rand, 1995).

Existen diferentes técnicas para evaluar la toxicidad de las aguas residuales; estas en general utilizan organismos de diversos niveles tróficos, entre los cuales se destacan: bacterias, protozoos, crustáceos, hasta organismos superiores como ranas, peces, ratas, ratones, células de humanos, etc. Los bioensayos proporcionan información valiosa con respecto a la toxicidad de soluciones mixtas sobre organismos vivos. La *Daphnia magna*, es un microcrustáceo que ha sido ampliamente utilizado como organismo de prueba en estudios de toxicidad aguda y crónica de una variedad de compuestos químicos presentes en los ecosistemas acuáticos. *D. magna*, es la especie más usada en el mundo en pruebas de toxicidad debido a su sensibilidad a los agentes tóxicos. Este microcrustáceo tiene un ciclo corto y se reproduce por partenogénesis, siendo fácil de manejar en el laboratorio (United States Environmental Protection Agency, EPA, 2002). *Vibrio fischeri*, es una bacteria marina luminiscente, que rápidamente y con alta sensibilidad puede detectar una variedad de compuestos tóxicos. Los productos químicos tóxicos inhiben el proceso de transferencia de electrones de la cadena transportadora de *V. fischeri* reduciendo la capacidad de producción de luz. Este bioensayo se puede utilizar como un indicador de toxicidad en mamíferos, debido a la similitud y compatibilidad génica existente entre estos organismos y *V. fischeri* (Wang, 2010; Rosenkranz, 1993).

Las microalgas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica en los sistemas acuáticos. En su condición de productor primario, el fitoplancton permite la entrada de energía al ecosistema, regula el régimen gaseoso y tiene acción depuradora, por lo que se considera uno de los indicadores más importantes de las alteraciones del medio marino. Se ha verificado su sensibilidad a los efluentes industriales y ha demostrado ser una herramienta válida

en el monitoreo y control de los programas de reducción de toxicidad, considerándose un indicador primario de contaminación (Bafana, 2011). La microalga *Selenastrum capricornutum* es sensible a sustancias tóxicas y por ello se utiliza en pruebas de toxicidad acuáticas.

El estado del arte que a continuación se presenta, muestra los resultados encontrados tras el uso de las técnicas para la medición de toxicidad en medios acuáticos asociadas al vertimiento de colorantes y pigmentos. Además además de lo anterior en el capítulo dos (2) se presenta el marco normativo vigente que reglamenta el uso de las pruebas de toxicidad en Colombia.

2. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE TOXICIDAD AGUDA EN AGUAS, AVALADAS POR LA LEGISLACIÓN COLOMBIANA

En la normativa colombiana, la Resolución 0062 de 2007 define los protocolos de laboratorio requeridos para desarrollar análisis ambientales, entre ellos los que conciernen a la evaluación de la toxicidad aguda en aguas. Esta Resolución contempla como principales protocolos y metodologías para la determinación de toxicidad acuática, el test de inmovilización de *Daphnia magna*, Inhibición de crecimiento de algas y la prueba de bioluminiscencia bacteriana (con la bacteria *Vibrio fischeri*); además, en aquellos casos en los cuales el resultado de toxicidad aguda en *D. magna* e inhibición de algas está cercano al límite del 50%, establece que debe realizarse una evaluación adicional con peces.

3. ESTADO DEL ARTE DE PRUEBAS DE TOXICIDAD ACUÁTICA

3.1 Toxicidad aguda para *Daphnia*

Entre los estudios de toxicidad aplicados sobre *Daphnias*, se evaluó el efecto del colorante azul directo 218, el cual presentó una alta toxicidad con valores de LC_{50} entre 3,6 y 6,0 mg/L. De acuerdo

con Bae y Freeman, los efectos adversos generados en *Daphnias*, son suficientes para predecir posibles daños e impactos sobre todos los ecosistemas que reciban aguas residuales contaminadas con la sustancia utilizada en el análisis. Esto evidencia la necesidad de que se realicen estudios toxicológicos en industrias relacionadas con productos químicos, entre ellas, las industrias de síntesis de colorantes (Bae y Freeman, 2005). En India, Verma (2008) aplicó la técnica de toxicidad aguda de *Daphnia magna* sobre efluentes industriales con contenido de colorantes reactivos, Remazol *green parrot* y Remazol amarillo, obteniendo valores de concentración efectiva para un porcentaje de inhibición del 50% de la población total de *Daphnias* (EC_{50}), del 55,32 y 46,84 mg/L, respectivamente. El autor indica que el ensayo con *Daphnia magna*, es un excelente método para la evaluación de la toxicidad acuática de tintes y colorantes que contienen los efluentes industriales. En general, los efluentes con presencia de colorantes y pigmentos pertenecientes al sector curtiembres, mostraron una mayor toxicidad respecto a los vertimientos de sectores como el textil y de papel (Verma, 2011). Dave y Aspegren, utilizaron *Daphnia magna* para determinar la toxicidad de efluentes textiles de acuerdo al protocolo establecido en la Norma ISO 6341 de 1982, para lo cual se tomaron 52 muestras de agua residual textil. Los valores de EC_{50} obtenidos fueron definidos en un rango entre 3,7 y 118 g/L tras 24 horas de exposición, y entre 1 y 182 g/L para las 48 horas de exposición. Para demostrar la toxicidad aportada por los efluentes textiles, Immich llevó a cabo una evaluación de la toxicidad de soluciones del colorante reactivo Remazol azul. Todas las muestras analizadas mostraron toxicidad aguda por encima del límite máximo permitido para los efluentes de la industria textil y de productos químicos (Immich, 2009).

2.2 Inhibición de crecimiento de algas

Con el fin de estudiar el tamaño de partículas y la solubilidad de los óxidos de metales, Aruoja y

Dubourguiera (2009) compararon la toxicidad de nanopartículas de ZnO, TiO₂ y CuO en su tamaño corriente; para los bioensayos se utilizó el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Las soluciones acuosas, a pesar de ser opacas, no mostraron un efecto significativo sobre la inhibición del crecimiento de las algas, en lo referente a la capacidad que poseen estas sustancias de disminuir el paso de la luz y afectar los procesos fotosintéticos. Tanto las partículas de Óxido de Zinc de gran tamaño como las nanométricas presentaron valores similares de toxicidad EC_{50} en el orden de 0,037 y 0,042 mg/L (para 72 horas de exposición), respectivamente. Esto evidencia un alto grado de toxicidad que fue atribuida a los iones de Zinc disueltos. Los resultados son congruentes con los reportados por Franklin, Rogers y Apte (2007), quienes al comparar el tamaño normal de las moléculas con su nanopartícula, utilizando el mismo organismo (*Pseudokirchneriella subcapitata*) se obtuvieron valores de EC_{50} durante 72 horas de exposición, de 0,068 y 0,063 mg/L, para las nanopartículas y la molécula normal. En el caso del Dióxido de Titanio la toxicidad reportada fue considerablemente menor a los demás óxidos metálicos. Se determinaron valores de EC_{50} para 72 horas de exposición de 5,8 y 35,9 mg Ti/L, para la nanopartícula y la molécula normal. Ambas soluciones formaban agregados que atrapaban microorganismos impidiendo el paso de la luz y por tanto inhibiendo su crecimiento. Estos valores indican que el mayor grado de toxicidad lo presentan las nanopartículas de TiO₂; una posible explicación a este efecto puede ser la sugerida por Baveye y Laba (2008) quienes enfocaron su investigación en las implicaciones toxicológicas de los agregados de las nanopartículas de Dióxido de Titanio, debido a que pueden resultar en actividades biológicas diferentes. Los autores explicaron el mecanismo de toxicidad de las suspensiones, como es el caso de la generación de radicales hidroxilo debido a la acción de la luz visible. Las nanopartículas de TiO₂ en combinación con luz ultravioleta (370 nm) inactivan las algas. Algo similar ocurrió con el Óxido de Cobre, donde las nanopartículas resultaron más

tóxicas que las moléculas de tamaño normal, presentando valores de EC_{50} durante 72 horas de exposición, de 71 y 11,55 mg/L, para las nanopartículas y las moléculas normales, respectivamente. La toxicidad de ZnO y CuO se puede atribuir a los iones metálicos solubles. En el caso del TiO_2 , el atrapamiento de las algas en los agregados de TiO_2 puede jugar un papel importante en la toxicidad sobre *Pseudokirchneriella subcapitata* (Aruoja y Dubourguiera, 2009).

Sponza (2006) investigó la toxicidad aguda de las aguas residuales de la industria de producción de colorantes químicos y destaca la importancia de las pruebas de toxicidad en las normas de vertimiento de aguas residuales. Utilizó diferentes organismos para representar cuatro niveles tróficos incluyendo bacterias, protozoos, peces y el alga *Chlorella vulgaris*. Las aguas residuales contenían varios tipos de colorantes, donde azul índigo se presentaba en mayor proporción. Las pruebas de toxicidad aguda para estos efluentes mostraron valores de EC_{50} (expresados como porcentaje de la muestra del efluente estudiado) entre el 80 (es decir, tomando un 80% de la muestra de agua residual y un 20% de agua destilada) y 100% (en el cual se toma un 100% de la muestra de agua residual y un 0% de agua destilada) indicando niveles de toxicidad bajos. Generalmente, los resultados de las pruebas de toxicidad aguda se expresan en EC_{50} , lo que significa que esta es la concentración que afecta a 50% de los organismos ensayados en diferentes volúmenes de efluente. Novotny (2006) realizó un estudio sobre algunos colorantes reactivos y dispersos para comparar el uso de tres pruebas diferentes de toxicidad aguda utilizando como organismos la bacteria *Vibrio fischeri*, la microalga *Selenastrum capricornutum* y el protozoo *Tetrahymena pyriformis*. La prueba de bioluminiscencia, aunque determina toxicidad, tiene una sensibilidad baja a los tintes oscuros y necesita más tiempo de aplicación. La prueba de inhibición de crecimiento de algas fue más sensible a los colorantes en comparación con la prueba de bioluminiscencia, y *T. pyriformis* es un organismo adecuado para medir toxicidad biológica, aunque no tan sensible

como las algas. Otros estudios comparativos se han realizado enfocados en la toxicidad de varios colorantes incluyendo los tipo ácido, reactivos, directos y baño que son comúnmente hallados en aguas residuales textiles. Tigrini (2011) comparó las técnicas con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, la prueba de Ames con *Salmonella typhimurium* y el *Lemna* test con *Lemna minor*. De los resultados se concluyó que *D. magna* es el organismo más sensible para efluentes con presencia de colorantes ácidos, los cuales tienen formación de espuma; de esta manera, los tensoactivos que contienen estos colorantes pueden afectar seriamente las *Daphnias*. Por tanto, *D. magna* es probablemente útil para evaluar el efecto de la “toxicidad física” ocasionada por los tensoactivos no detectables por otros organismos. La prueba de bioluminiscencia con la bacteria, *V. fischeri*, presentó limitaciones durante la evaluación de la toxicidad de pigmentos (sustancias insolubles) y de colorantes tipo baño, entre otros que producen coloraciones oscuras; la investigación determinó que estas limitaciones se producen por la interferencia del color y del material suspendido (pigmentos) sobre la emisión de luz de la bacteria. El alga *Pseudokirchneriella subcapitata* fue el organismo más sensible para la mayoría de aguas residuales evaluadas, lo que sugiere su uso en estudios sobre la ecotoxicología de efluentes de sectores textiles y de curtiembres.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Modelos de predicción de la toxicidad asociada al vertimiento de aguas residuales con presencia de colorantes y sólidos suspendidos

Con el objetivo de generar un modelo estadístico que permita predecir los efectos adversos producidos sobre los organismos acuáticos asociados a la capacidad que poseen los colorantes y sólidos suspendidos de inhibir la transmisión de la luz en el agua, y en consecuencia, reducir los procesos fotosintéticos, se desarrollaron dos diseños de

experimentos tipo Central Compuesto. Para ello de utilizó el software de estadística DESIGN EXPERT® V.9 (Stat-Ease, 2014), el cual tiene la capacidad de establecer modelos matemáticos o polinomios de correlación entre las variables principales y la variable de respuesta con un alto grado de precisión y de significancia estadística representada por el análisis de varianza (ANOVA). En ambos diseños, se utilizó como variable de respuesta, la toxicidad en algas, determinada a partir del test de inhibición del crecimiento de algas (Estándar ISO 8682). La selección de la prueba de toxicidad, se realizó teniendo en cuenta los resultados y recomendaciones citadas por diferentes autores, además de las reducidas limitaciones que presenta la prueba cuando se utilizan colorantes, a diferencia de la prueba de bioluminiscencia bacteriana, en la cual los colorantes y los sólidos suspendidos interfieren con la medición.

Los modelos estadísticos desarrollados para la estimación de la toxicidad asociada a una concentración de colorante específica y de sólidos totales presentes en el agua residual, permitirán en un futuro, una vez sean calibrados y validados, hacer predicciones y cuantificaciones de los efectos adversos generados sobre los organismos acuáticos, a partir de la caracterización físico química del efluente en términos de color y sólidos totales.

4.1.1 Inhibición del crecimiento de algas asociada a colorantes

Diseño de experimentos

Para la evaluación de la toxicidad asociada a colorantes, en agua, fueron utilizadas de acuerdo al diseño experimental, cinco anilinas vegetales de uso frecuente en la industria de alimentos, lo cual

reduce los efectos adversos asociados a la molécula constituyente del colorante y pone en evidencia los efectos relacionados con la disminución de la transmisión de la luz en el medio acuático.

El diseño experimental Central Compuesto, utilizó como variable de respuesta la toxicidad expresada en forma porcentual, que representa la reducción de la tasa de duplicación celular del organismo *Selenastrum Capricornutum*. Como variables principales (aquellas que tienen influencia directa en el fenómeno o proceso), se estudió el efecto de la longitud de onda de máxima absorbancia (nm) distribuidas en el rango entre 400 y 700 nm y, la concentración del colorante (mg/L) entre 62,5 y 250 mg/L. El intervalo de concentraciones de colorante seleccionado, no tuvo interferencias con la prueba de toxicidad. En resumen, fueron realizados de acuerdo al diseño experimental, 13 experimentos con base en la **Tabla 1**.

Implicaciones de la variable longitud de onda de máxima absorbancia

La investigación de los efectos asociados a la reducción de la cantidad de luz disponible para los procesos fotosintéticos, requirió la búsqueda de una variable objetiva de importancia en el fenómeno de transmisión de la luz, pero que no fuera a su vez subjetiva (dependiente del observador), como lo es la designación tradicional de colores (rojo, azul, amarillo, etc.). En consecuencia, se selecciona la longitud de onda de máxima absorbancia, como variable objetiva en el modelo de predicción, de fácil medición, y que además posee un valor numérico asociado, lo que facilita el uso del modelo estadístico.

TABLA 1. CONCENTRACIONES Y LONGITUDES DE MÁXIMA ABSORBANCIA UTILIZADAS									
Concentración (mg/L)	250	288,8	156,3	62,5	156,3	23,66	62,5	156,3	250
Longitud de onda (nm)	454	517	427	580	517	517	454	606	580
Color									

Adicional a lo anterior, se determinó la concentración letal (LD50) del colorante Rojo 40 utilizando algas, con el fin de hacer comparaciones cualitativas con la prueba de toxicidad de *Daphnias*.

4.1.1 Inhibición del crecimiento de algas asociada a sólidos totales

Diseño de experimentos

Análogo a los efectos adversos generados por los colorantes en el medio acuático, los sólidos suspendidos inhiben la transmisión de la luz a mayores profundidades con influencias sobre los procesos fotosintéticos. El diseño experimental utilizó como variable de respuesta la reducción de la tasa de duplicación celular del organismo *Selenastrum Capricornutum*, y como variable principal la concentración de sólidos totales expresada mg/L en el rango de 30 a 100 mg/L. El número total de experimentos realizados fue de 7, utilizando el diseño Central Compuesto.

Las pruebas se realizaron con un sólido inerte (Óxido de Silicio) para asegurar que la toxicidad no fuera por el aspecto molecular sino por la inhibición del paso de la luz, el cual es el parámetro que afecta el crecimiento de las algas.

4.2 Evaluación de la toxicidad asociada a los principales colorantes y pigmentos utilizados en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá

Con la finalidad de evaluar la ecotoxicidad de algunas de las principales materias primas utilizadas por los sectores industriales que a continuación se presentan, además de la eficiencia de los sistemas de tratamiento utilizados en ellos, se implementó la prueba de inmovilización de *Daphnias* de acuerdo a la Norma ISO 6341 de 1982.

Sectores industriales evaluados: sector textil, químicos, curtiembres, artes gráficas, tratamiento de aguas residuales, papel, cerámicos, metal mecánico, alimentos y bebidas.

Colorantes y pigmentos evaluados: índigo Carmín, Rojo 40, Amarillo N° 5, Sulfato Básico de

Cromo, Óxido de Hierro Negro, Dióxido de Titanio, Óxido de Zinc, Rodamina β, Óxido de Cobre y Óxido de Hierro Rojo.

De los sectores industriales mencionados anteriormente, se seleccionaron cuatro empresas pertenecientes al sector textil, papel, químico y de saneamiento (tratamiento de aguas residuales). A estas empresas se les desarrolló un programa de monitoreo aplicado sobre los sistemas de tratamiento de aguas residuales (entradas y salidas). La toxicidad de muestras fue analizada utilizando la prueba de toxicidad de *Daphnias* y de algas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelo de toxicidad asociada al color

El polinomio de correlación obtenido a partir del diseño de experimentos, toxicidad sobre algas asociada a la longitud de onda de máxima absorbanza (A) y concentración del colorante (B), es descrito por la **Ecuación (1)**

$$\begin{aligned} \text{Ln (Toxicidad)} = & - (57.24471 + \\ & 0.21066 \text{ A}) + (0.027246 \text{ B}) \\ & - (4.33653\text{E-}5 \text{ A B}) - (1.79870\text{E-}4 \\ & \text{A}^2) - (6.48280\text{E-}6 \text{ B}^2) \end{aligned} \quad (1)$$

La **Tabla 2**, muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el diseño central compuesto aplicado.

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza, el valor de la prueba de Fischer (F) para el modelo (649,81) indica que este es significativo. Los valores de "Probabilidad > F" que son menores que 0,0500 señalan los términos significativos del modelo, para este caso son A, B, AB, A². Los valores superiores a 0,1000 indican los términos de modelo que no son significativos. La deficiencia del ajuste del valor F (2,17) no es significativa en relación con el error puro. Existe un 23,47% de probabilidad de que la falta de ajuste del valor F sea grande, esto podría ocurrir debido al ruido incluido por el valor de cada variable.

TABLA 2. RESULTADOS ANOVA DISEÑO DE EXPERIMENTO DE TOXICIDAD POR COLOR

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor p Prob > F
Modelo	14,54	5	2,91	649,81	< 0,0001
A: Longitud de Onda	10,17	1	10,17	2272,99	< 0,0001
B: Concentración	0,55	1	0,55	123,20	< 0,0001
AB	0,26	1	0,26	58,63	0,0001
A²	3,55	1	3,55	792,17	< 0,0001
B²	0,023	1	0,023	5,05	0,0595
Residual	0,031	7	4,476E-3		
Falta de ajuste	0,019	3	6,464E-3	2,17	0,2347
Error puro	0,012	4	2,984E-3		
Corr. Total	14,57	12			
Desviación estándar		0,067		R²	0,9979
Media		3,71		R² ajustado	0,9963
C.V. %		1,80		R² predicho	0,9893
PRESS		0,16		Precisión adecuada	74.495

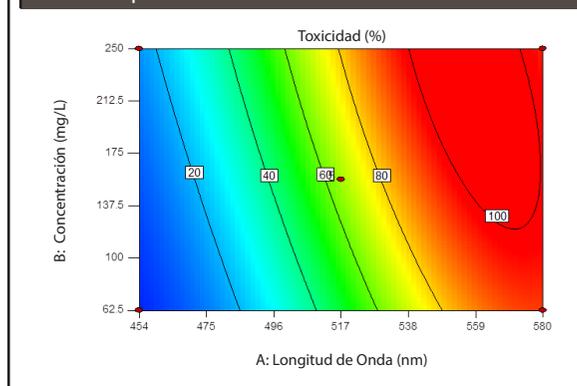
El R² predicho (0.9893) está acorde con el R² ajustado de 0,9963; es decir, la diferencia es menor que 0,2.

La precisión adecuada mide la relación señal-ruido. Es deseable una proporción mayor de 4. El valor de 74.495 indica una señal adecuada. Este modelo se puede utilizar para predecir en el rango definido para las variables principales.

De acuerdo a la información obtenida mediante el análisis ANOVA de los resultados del diseño de experimento, el modelo de toxicidad por color puede predecir el 99% de las respuestas utilizando como variables principales la longitud de onda de máxima absorbancia (entre 400 y 610 nm) y la concentración del colorante. El método no puede predecir valores de longitud de onda mayores a 610 nm debido a que existen interferencias en la lectura del crecimiento de algas para valores cercanos a 670 nm.

La concentración letal, LD50, del Rojo 40 sobre el organismo *Selenastrum Capricornutum* fue de 12,43 ppm.

Figura 1. Superficie de respuesta diseño experimental: Toxicidad por color



Modelo de toxicidad asociado a sólidos totales

La **Ecuación 2** presenta el modelo estadístico obtenido tras efectuar un análisis de varianza de los resultados del diseño experimental de sólidos totales. El modelo predice los efectos asociados a la presencia de sólidos totales (A) en las aguas residuales sobre el organismo *Selenastrum Capricornutum*.

TABLA 3. RESULTADOS ANOVA DISEÑO DE EXPERIMENTO DE TOXICIDAD POR SÓLIDOS TOTALES

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Valor p Prob > F
Modelo	7,015E-4	1	7,015E-4	120,74	0,0001
A-Sólidos Totales	7,015E-4	1	7,015E-4	120,74	0,0001
Residual	2,905E-5	5	5,810E-6		
Falta de ajuste	2,905E-5	3	9,684E-6		
Error puro	0,000	2	0,000		
Corr. Total	7,306E-4	6			
Desviación estándar		0,9602	R ²		0,9602
Media		0,9523	R ² ajustado		0,9523
C.V. %		0,9408	R ² predicho		0,9408
PRESS		19,382	Precisión adecuada		19.382

$$(\text{Toxicidad})^{-1/2} = 0.17292 - 6.24297E-4 A \quad (2)$$

La **Tabla 3**, muestra el análisis de varianza desarrollado para el diseño experimental aplicado.

El valor F para el modelo fue 120,74, lo que indica que es significativo. El R² predicho (0,9408) está razonablemente de acuerdo con el R² ajustado (0,9523), es decir, la diferencia es menor que 0,2. La precisión adecuada mide la relación señal-ruido. Es deseable una proporción mayor de 4. El valor de 19.382 indica una señal adecuada. Este modelo se puede utilizar para predecir en el rango definido para las variables principales.

De acuerdo a la información obtenida mediante el análisis ANOVA, el modelo de toxicidad por sólidos totales puede predecir el 94% de las respuestas utilizando como variable principal la concentración de sólidos totales.

Se aplicó el ensayo de inhibición de crecimiento de algas para determinar la dosis letal (LD50) de los sólidos en una muestra de agua con presencia de óxido de silicio. El resultado obtenido fue que con una concentración de sólidos de 48,683 ppm se inhibe la mitad del crecimiento de las algas.

Ecotoxicidad de algunas materias primas utilizadas por los sectores industriales del Área Metropolitana del Valle de Aburrá

La **Tabla 4** presenta los resultados de la aplicación de la prueba de toxicidad de *Daphnias* sobre aguas residuales con presencia de algunas de las materias primas más utilizadas por los sectores industriales del Área Metropolitana del Valle de Aburrá.

TABLA 4. RESULTADOS PRUEBA DE LA TOXICIDAD DE DAPHNIAS APLICADA SOBRE LAS PRINCIPALES MATERIAS PRIMAS DEL ÁREA METROPOLITANA DEL VALLE DE ABURRÁ

Colorante	24h LD50 (ppm)	48h LD50 (ppm)
Índigo carmín	---	970
Óxido de cobre	200	25
Óxido de hierro amarillo	1550	1200
Óxido de zinc	860	92
Óxido de hierro negro	11000	5000
Óxido de hierro rojo	8000	7000
Óxido de cromo verde	6000	4700
Dióxido de titanio	8700	8700
Rojo 40	10000	700
Anilina vegetal amarilla	5800	5650
Rodamina β	65	57

A partir de los resultados anteriores, es posible afirmar, teniendo en cuenta el marco normativo que establece el uso de la prueba de toxicidad de *Daphnias* (Resolución 062 de 2007), que los efluentes contaminados con Rodamina β generan mayor toxicidad sobre el ecosistema acuático. Vale la pena indicar que la prueba de *Daphnias*, se asocia a toxicidad producida por la naturaleza química de la molécula.

Adicionalmente, se puede apreciar en la **Tabla 4**, que el incremento del tiempo de exposición, disminuye el valor de LD50, tal y como lo expresan múltiples autores.

Al comparar el resultado de LD50 obtenido para el Rojo 40, mediante la prueba de toxicidad de *Daphnias* (700 ppm) y de algas (12,43 ppm), se aprecia el efecto de la naturaleza de ambas toxicidades, es decir, la toxicidad de la molécula constitutiva del colorante y los generados por la reducción de la cantidad de luz disponible para el desarrollo de los procesos fotosintéticos.

Toxicidad de efluentes de los sectores: textil, químico, papel y de saneamiento (tratamiento de aguas)

Se analizó la toxicidad de muestras de agua residual (a la entrada y salida de los sistemas de tratamiento) de cuatro de las empresas más representativas de los sectores productivos anteriormente seleccionados; la **Tabla 5**, presenta la caracterización de los efluentes evaluados.

Los resultados de las dosis letales a las 24 horas para las *daphnias* indican altos niveles de toxicidad en los vertimientos de aguas residuales de estos sectores. Mientras menor sea el porcentaje de la LD50, mayor es la toxicidad que representa, es decir, con una poca cantidad de contaminante se logra un efecto letal para la mitad de la población. Bajo este criterio podemos decir que los sectores químico y textil son los que presentan aguas residuales más tóxicas. A estos les sigue el sector de papeles y finalmente el sector de tratamiento de aguas residuales.

TABLA 5. PROPIEDADES DE LAS MUESTRAS DE LAS EMPRESAS

Sector Empresa	pH	Redox (mV)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Sólidos totales (ppm)
Químico **	8,86	174,9	186,8	2695
Papeles *	7,43	188,1	829	1989
Papeles **	7,25	-31,6	909	1186
Tratamiento de aguas residuales *	7,25	49,0	1239	1232
Tratamiento de aguas residuales **	7,47	61,8	1150	713
Textiles *	12,40	32,5	5,72	3662
Textiles **	9,68	46,4	2,23	2162

*Entrada al sistema de tratamiento, ** Salida del sistema de tratamiento

TABLA 6. RESULTADOS PRUEBAS DE TOXICIDAD CON ALGAS Y DAPHNIAS SOBRE LOS EFLUENTES DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE LAS EMPRESAS SELECCIONADAS

Sector empresa	Daphnias 24h EC50	Daphnias 48h EC50	Algas 72h EC50
Químico **	8%	6%	---
Papeles *	20%	12,5%	---
Papeles **	68%	50%	---
Tratamiento de aguas residuales *	25%	17%	2,7%
Tratamiento de aguas residuales **	73%	59%	6%
Textiles *	10%	5%	1,74%
Textiles **	38%	28%	3,5%

*Entrada al sistema de tratamiento, ** Salida del sistema de tratamiento

La toxicidad del sector químico solo se determinó para la salida del sistema de tratamiento, debido a la fuerte coloración oscura que presentó la muestra, aun con las diluciones respectivas causó interferencia en las pruebas de toxicidad.

El sector textil, al igual que el químico, tuvo unos valores de toxicidad muy altos, incluso a la

salida de la planta de tratamiento, la toxicidad sigue siendo alta.

Los sectores de papeles y de tratamiento de aguas residuales presentaron un valor de toxicidad menor a la salida de sus sistemas de tratamiento; sin embargo, sus vertimientos siguen siendo tóxicos.

Los resultados de las dosis letales a las 48 horas para las *Daphnias* muestran valores de dosis letales aun menores, es decir, luego de 48 horas de contacto con el compuesto tóxico, la mortalidad de la mitad de la población se obtiene a partir de bajas concentraciones, lo cual representa un grado de toxicidad al comprar este color con el reportado a las 24 horas de evaluación.

El caso de las algas es todavía más crítico. Los resultados indican que las algas son susceptibles a estas aguas residuales. Todas las muestras presentaron niveles de toxicidad bastante altos. Por ejemplo, para el caso de la industria textil, el agua antes de la planta de tratamiento tiene una dosis letal de 1,74%, es decir, si se diluyera este volumen de agua contaminada en un 1,74% en agua destilada resultaría en una inhibición del crecimiento del 50% de las algas.

Las muestras de las salidas de los sistemas de tratamiento de los sectores textil y de saneamiento, muestran valores de toxicidad significativamente altos (3,5 y 6%).

La prueba de algas para los sectores químico y de papeles, evidenció que los efluentes a la entrada y salida del sistema de tratamiento, resultan ser altamente tóxicos. No se logra determinar su LD50 debido a que para todas las diluciones evaluadas se obtuvo una mortalidad de toda la población de organismos.

6. CONCLUSIONES

Modelo de predicción de los efectos adversos generados por colorantes y sólidos totales sobre organismos acuáticos

De conformidad con los resultados obtenidos, los modelos estadísticos pueden ser empleados para

la predicción de los efectos asociados a colorantes y sólidos totales presentes en las aguas residuales; sin embargo su implementación está restringida por la longitud de onda de máxima absorbancia (aplica para valores < 610 nm) además de los efectos asociados a la toxicidad molecular, los cuales pueden ser estimados a partir de la prueba de toxicidad de *Daphnias*.

Toxicidad de materias primas utilizadas por los principales sectores industriales del Área Metropolitana del Valle de Aburrá

Las materias primas con mayores efectos negativos (toxicidad molecular) sobre organismos acuáticos, evidenciados a partir de la prueba de *Daphnias*, fueron los efluentes con presencia de Rodamina β , y en menor proporción los que presentaban óxidos de cobre. Se comprobó que las dosis letales (LD50) disminuyen gradualmente con el tiempo de exposición. Los óxidos de hierro presentaron, en general, los valores de LD50 mayores de acuerdo a la prueba de toxicidad de *Daphnias*.

Al analizar el comportamiento de sustancias solubles (colorantes como el Rojo 40), se encuentra que los valores de toxicidad molecular (LD50) fueron en orden de magnitud 60 veces mayores al valor de toxicidad asociado a la capacidad que poseen estas sustancia de reducir la transmisión de la luz, lo que de acuerdo a múltiples autores, es el resultado de la sensibilidad de las algas a los cambios de la cantidad de luz disponible para sus procesos fotosintéticos.

Evaluación de la toxicidad de efluentes de los sistemas de tratamiento de empresas de papel, químicos, saneamiento y textiles

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, tras aplicar la prueba de toxicidad de *Daphnias* y de algas, se observa una disminución en el grado de toxicidad de los efluentes a la entrada de los sistemas de tratamiento; sin embargo, de acuerdo al protocolo de calificación del riesgo implementando el índice de contaminación por toxicidad, ICOTOX, se califican los vertimientos del sector químico y

textil como tóxicos, mientras que los de papel y de saneamiento tienen calificación moderada; es decir que los vertimientos de estos sectores, actualmente son generadores potenciales de toxicidad en el Río Aburrá – Medellín, teniendo mayor impacto sobre organismos fotosintéticos.

En general, fue posible comprobar la efectividad de la prueba de *Daphnias* y algas, para determinar la toxicidad de molecular y la asociada al color de las principales materias primas y vertimientos de algunos sectores industriales del Área Metropolitana del Valle de Aburrá.

6. REFERENCIAS

- Aruoja, V.; Dubourguier, H.C.; Kasemets, K.; Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ*, 407(4), pp. 1461-1468. [Online] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969708010784>.
- Bae, J.; Freeman, H. (2005). Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments*, 73(1), pp 81-85. [Online] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143720805003505>.
- Bafana, A.; Saravana Devi, S.; Chakrabarti T. (2011). Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews*, 19(1), pp. 350-370. [Online] Disponible en: <https://doi.org/10.1139/a11-018>
- Baveye, P.; Laba, M. (2008). Aggregation and toxicology of titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Health Perspectives*, 116(4). [Online] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2290978/>.
- Cámara de Comercio de Medellín para Antioquia (2012). Las 500 empresas más grandes de Antioquia, 2011. RAED. Revista Antioqueña de Economía y Desarrollo. Ed. 4.
- Dave, G.; Aspegren, P. (2010). Comparative toxicity of leachates from 52 textiles to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), pp. 1629-1632 [Online] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651310001338>.
- Franklin, N.M.; Rogers, N.J.; Apte, S.C.; Batley, G.E.; Gadd, G.E.; Casey, P.S. (2007). Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environ. Sci. Technol.*, 41 (24), pp. 8484–8490. [Online] Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/>.
- Gupta V.K.; Suhas. (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal--a review. *J Environ Manage*, 90(8), pp. 2313-2342. [Online] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479708003290>.
- Novotný, C.; Dias, N.; Kapanen, A.; Malachová, K.; Vándrovová, M.; Itävaara, M.; Lima, N. (2006). Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere*, 63(9), pp. 1436-1442. [Online] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653505011380>.
- Rand, G. (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Segunda edición. Estados Unidos, Ed. Taylor & Francis, 1995. pp 3-18.
- Resolución 0062 de 2007 (2007). Bogotá, Colombia. Marzo.
- Rosenkranz, H. (1993). *Similarities in the mechanisms of antibacterial activity (Microtox assay) and toxicity to vertebrates*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Serafini Immich, A.P.; Ulson de Souza, A.A.; Guelli Souza, S. (2009). Removal of Remazol Blue RR dye from aqueous solutions with Neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), pp. 1580-1585. [Online] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/23444395-Removal_of_Remazol_Blue_RR_dye_from_aqueous_solutions_with_Neem_leaves_and_evaluation_of_their_acute_toxicity_with_Daphnia_magna.
- Sharma, K.P.; Sharma, S.; Sharma, S.; Singh, P.K.; Kumar, S.; Grover, R.; Sharma, P.K. (2007). A comparative study on characterization of textile wastewaters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests. *Chemosphere*, 69(1), pp. 48-54. [Online] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507005929>
- Sponza, D. (2006). Toxicity studies in a chemical dye production industry in Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 138(3), pp. 438-447. [Online] Disponible

- en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389406008351>.
- Stat-Ease (2014). Design Expert Software, Versión 9. Disponible en <http://www.statease.com/software/dx9-trial.html>.
- Tigini, V.; Giansanti, P.; Mangiavillano, A.; Pannocchia, A.; Varese, G.C. (2011). Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicol Environ Saf*, 74(4), pp. 866-873. [Online] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651310003842>.
- United States Environmental Protection Agency, EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. .Quinta edicion.
- Verma, Y. (2011). Toxicity assessment of dye containing industrial effluents by acute toxicity test using *Daphnia magna*. *Toxicology and industrial health*, 27(1), pp. 41-49. [Online] Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233710380218>.
- Verma, Y. (2008). Toxicity Evaluation of Effluents from Dye and Dye Intermediate Producing Industries Using *Daphnia* Bioassay. *Journal of Toxicology*, 4(8), pp. 1-7.[Online] Disponible en: <https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/11717>.
- Wang, K.S.; Wei, M.C.; Peng,T.H.; Li, H.C.; Chao, S.J.; Hsu, T.F.; Lee, H.S.; Chang, S.H. (2010).Treatment and toxicity evaluation of methylene blue using electrochemical oxidation, fly ash adsorption and combined electrochemical oxidation-fly ash adsorption. *J Environ Manage*, 91(8), pp.1778-1784. [Online]. Disponible en:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479710000940>.

**PARA CITAR ESTE ARTÍCULO /
TO REFERENCE THIS ARTICLE /
PARA CITAR ESTE ARTIGO /**

Barrios-Ziolo, L.F.; Gaviria-Restrepo, L.F.; Agudelo, E.A.; Cardona-Gallo, S.A. (2016). Estudio de la toxicidad asociada al vertimiento de aguas residuales con presencia de colorantes y pigmentos en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá. *Revista EIA*, 13(26), julio-diciembre, pp. 61-74. [Online]. Disponible en: <https://doi.org/10.24050/reia.v13i26.742>