



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y AMBIENTALES “ECAA”

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

**“CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA EN RENACUAJOS DE LA RANA
(*Gastrotheca riobambae*) EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE N-
FOSFONOMETILGLICINA.”**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 2. Ambiente y Biodiversidad

Sublínea: 2.2 Evaluación de Impactos Ambientales

AUTOR: JOSÉ ANGEL ACERO CHAMBA

ASESOR: MVZ. TITO JORGE MENDOZA CADENA MSc.

IBARRA, MARZO 2019



CERFIFICACIÓN

Ibarra, 10 de marzo del 2019

M.V.Z. Tito Jorge Mendoza Cadena MSc
ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra; en consecuencia, Autorizo su presentación para los fines legales pertinentes

(f) 

M.V.Z. Tito Jorge Mendoza Cadena MSc
C.C: 100280229-4



APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinado, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

(f) 

M.V.Z. Tito Jorge Mendoza Cadena MSc

C.C:100280229-4

(f) 

Ing. Paola Alexandra Chávez Guerrero Mgs

C.C:100274409-0

(f) 

Ing. Santiago Xavier Mafla Andrade MSc

C.C:100265839-9



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, José Angel Acero Chamba, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 10 de marzo del 2019

(f) 

José Angel Acero Chamba

C.C:100419889-9



AUTORÍA

Yo, José Angel Acero Chamba, portador de la cedula d ciudadanía N°10041989-9, declaro bajo juramento que esta investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresarme a la Pontifica Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

(f) 

José Angel Acero Chamba

C.C:100419889-9



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: José Angel Acero Chamba, con CC: 100419889-9, autor del trabajo de grado intitulado: “CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA EN RENACUAJOS DE LA RANA (*Gastrotheca riobambae*) EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE N-FOSFONOMETILGLICINA.”, previo a la obtención del título profesional de “INGENIERO EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO”, en la Escuela de CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES (ECAA)

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 10 de marzo del 2019

(f) 

José Angel Acero Chamba

C.C. 100419889-9



DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA EN RENACUAJOS DE LA RANA (*Gastrotheca riobambae*) EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE N- FOSFONOMETILGLICINA”, lo propuesto en el Código de Ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 14 de diciembre de 2016.

Para constancia firma:

José Angel Acero Chamba

Estudiante que ejecuta el Trabajo de Titulación

C.C.: 100419889-9

Carrera: Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo

Ibarra, 14 de diciembre de 2016



DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico al ser supremo que es Dios,
con infinito amor a mis padres José Acero y Neida Chamba,
quien son el motivo de superación y guía del sendero de la verdad,
agradecer por su apoyo incondicional eh incansable,
para mi desarrollo personal integral,
y ser ejemplo de superación.

José Angel Acero chamba



AGRADECIMIENTO

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra por ser en centro de mi formación profesional,

a la escuela ECAA por permitir que mis conocimientos y potencialidades se

desarrollen, a los maestros por su perseverancia y entrega en su labor educativa

Un Agradecimiento especial al MSc. Tito Mendoza por seguía y asesor de la investigación

A todas las personas que colaboraron con esta investigación, maestros, amigos y familiares que ayudaron en esta fase de superación y formación profesional.

José Angel Acero Chamba



1. RESUMEN

El N-fosfometilglicina (glifosato) es un herbicida ampliamente utilizado en la agricultura para el control de malezas, pero su uso continuo y excesivo ha generado problemas de toxicidad en ecosistemas acuáticos – terrestres por su estabilidad química, como es la biodegradación y biocumulación en la cadena trófica. En el caso de anfibios cumplen un rol muy fundamental ya que son el grupo de vertebrados considerados excelentes indicadores ambientales por tener un ciclo de vida, acuático –terrestre, además de desarrollar un papel importante en el ecosistema como depredador o presa para ayudar a mantener el equilibrio de la naturaleza.

El presente estudio consistió en caracterizar suelos de actividad agrícola de la parroquia La Esperanza y analizar la presencia de N-fosfometilglicina por técnicas de HPLC, obteniendo resultados de $0,1\text{mg.kg}^{-1}$ en suelo removido para siembra de maíz, $0,0\text{ mg.kg}^{-1}$ en suelo de cultivo de maíz en cosecha y $0,4\text{mg.kg}^{-1}$ en suelo de cultivo de cebada, además evaluar la dosis letal en renacuajos de la rana marsupial andina *Gastrotheca riobambae* con la finalidad de dar a conocer su importancia como bioindicador.

El ensayo toxicológico refleja diferentes comportamientos en renacuajos de la *Gastrotheca riobambae* tales como agresividad, periodo de inactividad y finalmente la muerte, la DL_{50} fue $7487,26\text{mg.l}^{-1}$ y la DL_{100} fue $9791,44\text{mg.l}^{-1}$ con una mortalidad total de la población.

Palabras claves: Toxicidad, N-fosfometilglicina, *Gastrotheca riobambae*, anuros



2. ABSTRACT

N-phosphonomethylglycine (glyphosate) is a herbicide widely used in agriculture for the control of weeds, but its continuous and excessive use has generated problems of toxicity in aquatic - terrestrial ecosystems due to its chemical stability, such as biodegradation and biocumulation in the food chain. In the case of amphibians they play a very fundamental role since they are the group of vertebrates considered excellent environmental indicators for having a life cycle, aquatic -terrestrial, in addition to developing an important role in the ecosystem as a predator or prey to help maintain the balance of nature.

The present study consisted in characterizing agricultural activity soils of the La Esperanza parish and analyzing the presence of N-phosphonomethylglycine by HPLC techniques, obtaining results of 0.1mg.kg^{-1} in soil removed for maize sowing, 0.0 mg .kg^{-1} in maize crop soil in harvest and 0.4mg.kg^{-1} in barley culture soil, in addition to evaluate the lethal dose in tadpoles of the Andean marsupial frog *Gastrotheca riobambae* with the purpose of publicizing its importance as a bioindicator.

The toxicological test reflects different behaviors in tadpoles of the *Gastrotheca riobambae* such as aggressiveness, inactivity period and finally death, the LD_{50} was 7487.26mg.l^{-1} and the DL_{100} was 9791.44mg.l^{-1} with a total mortality of the population

Key Words: Toxicity, N-phosphonomethylglycine, *Gastrotheca riobambae*, anurans.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERIFICACIÓN	ii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iv
AUTORÍA	v
DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN.....	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTO	ix
1. RESUMEN	x
2. ABSTRACT	xi
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1 Planteamiento del problema.....	2
3.2 Justificación.....	3
3.3 Objetivos	3
3.3.1 Objetivo general.....	3
3.3.2 Objetivos específicos	3
3.4 Hipótesis.....	4
4. ESTADO DEL ARTE	5
4.1 Bioensayos	5
4.1.1 Clases de Bioensayo	5
4.1.1.1 Letales y agudo	5
4.1.1.2 Sub-letales o crónicas	6
4.1.2 Organismo de estudio	6



4.2	Características del glifosato	6
4.2.1	Presencia en el ambiente	7
4.2.1.1	Movilidad.....	7
4.2.1.2	Persistencia	8
4.2.1.3	Toxicidad en sistemas acuáticos	8
4.2.1.4	Toxicidad en anfibios.....	8
4.3	Descripción de (<i>Gastrotheca riobambae</i>).....	9
4.3.1	Características generales.....	9
4.3.2	Taxonomía	10
4.3.3	Estructura biológica	10
4.3.4	Alimentación.....	11
4.3.5	Madurez sexual	11
4.3.6	Reproducción	11
4.3.7	Requerimientos ambientales	12
4.3.7.1	Agua.....	12
4.3.7.2	Humedad	13
4.3.7.3	Temperatura	13
4.3.8	Valor comercial.....	13
4.3.9	Estudios de toxicidad en la rana marsupial andina como bioindicador	14
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1	Características del área en estudio	15
5.2	Materiales	16
5.2.1	Materias primas.....	16
5.2.2	Materiales	16



5.2.3	Equipos	16
5.2.4	Reactivos.....	17
5.2.5	Otros.....	17
5.3	Tipo de investigación	17
5.3.1	Investigación descriptiva	17
5.3.2	Investigación experimental	17
5.4	Metodología	18
5.4.1	Técnicas	18
5.4.1.1	Observación	18
5.5	Manejo y análisis de datos	18
5.5.1	Variables	18
5.5.1.1	Independientes: Dosis de N-fosfonometilglicina.....	18
5.5.1.2	Variable dependiente	18
5.5.1.3	Variables de control.....	19
5.5.2	Análisis estadístico.....	19
5.6	Manejo del ensayo.....	20
5.6.1	Caracterización del suelo de la parroquia La Esperanza	20
5.6.1.1	Toma de muestras	20
5.6.1.1.1	Muestra de suelo	20
5.6.2	Análisis de muestras	22
5.6.3	Preparación de muestra de suelo.....	22
5.6.4	Estándar de medición.....	22
5.6.5	Operación del cromatográfico	23
5.6.6	Adecuación de acuarios	23



5.6.7	Captura de renacuajos	24
5.6.8	Colocación de los renacuajos en los acuarios	25
5.6.9	Suministro de alimento	25
5.6.10	Colocación de N-fosfonometilglicina	25
5.6.11	Parámetros evaluados	25
5.6.11.1	Temperatura y pH	25
5.6.11.2	Conductividad eléctrica.....	26
5.6.11.3	Oxígeno disuelto	27
5.7	Determinación de la DL ₅₀ y DL ₁₀₀ por HPLC en agua	28
5.7.1	Toma de muestras	28
5.7.2	Preparación de muestras	29
5.7.3	Técnica aplicada	29
5.7.4	Procedimiento cromatográfico.....	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1	Georreferenciación de los puntos de muestro en la parroquia La Esperanza	30
6.2	Determinación de N-fosfonometilglicina en las muestras de suelo	31
6.3	Tamaño de los renacuajos	32
6.4	Evaluación de la dosis letal de N-fosfonometilglicina.....	32
6.5	Variables de control	33
6.5.1	Temperatura (°C).....	33
6.5.2	pH.....	35
6.5.3	Conductividad eléctrica	37
6.5.4	Oxígeno disuelto	38
6.6	Determinación de la DL ₅₀ DL ₁₀₀ por HPLC.....	40



6.7	Sensibilidad.....	41
6.8	Mortalidad.....	42
6.9	Análisis estadístico a la octava semana.....	44
6.10	Socialización	46
7.	CONCLUSIONES.....	48
8.	RECOMENDACIONES	49
9.	BIBLIOGRAFÍA	50



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Propiedades fisicoquímicas de N-fosfonometilglicina</i>	7
Tabla 2. <i>Descripción taxonómica de la rana marsupial andina (Gastrotheca riobambae)</i>	10
Tabla 3. <i>Datos generales de la parroquia La Esperanza</i>	16
Tabla 4. <i>Variable independiente</i>	18
Tabla 5. <i>Diseño experimental (DCA)</i>	19
Tabla 6. <i>Parámetros de las muestras de suelo</i>	21
Tabla 7. <i>Técnica aplicada para análisis de N-fosfonometilglicina en suelo por HPLC</i>	22
Tabla 8. <i>Técnica aplicada para análisis de N-fosfonometilglicina en agua por HPLC</i>	29
Tabla 9. <i>Concentración de N-fosfonometilglicina en muestras de suelo</i>	31
Tabla 10 . <i>Determinación de la Dosis Letal (DL50 y DL100) acumulada en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina</i>	33
Tabla 11. <i>Valores de Temperatura en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina</i>	34
Tabla 12. <i>Valores pH en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina</i>	35
Tabla 13. <i>Valores de Conductividad Eléctrica en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina</i>	37
Tabla 14. <i>Valores de oxígeno disuelto en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina</i>	38
Tabla 15. <i>Resultados de DL₅₀ y DL₁₀₀ de N- fosfonometilglicina por HPLC</i>	40
Tabla 16. <i>DL₅₀ Y DL₁₀₀ de N-fosfonometilglicina final</i>	40
Tabla 17. <i>Muerte registrada de los renacuajos durante las 8 semanas en función de N-fosfonometilglicina</i>	43
Tabla 18. <i>Análisis de varianza mortalidad de renacuajos</i>	45



ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Metamorfosis de la rana <i>Gastrotheca riobambae</i>	12
<i>Figura 2.</i> Parroquia La Esperanza	15
<i>Figura 3.</i> Toma de muestras de suelos parroquia La Esperanza	21
<i>Figura 4.</i> Adecuación acuarios	23
<i>Figura 5.</i> Captura de renacuajos	24
<i>Figura 6.</i> Toma de medidas de renacuajos	24
<i>Figura 7.</i> Potenciómetro	26
<i>Figura 8.</i> Conductímetro	27
<i>Figura 9.</i> Oxímetro	28
<i>Figura 10.</i> Puntos de recolección de muestras	30
<i>Figura 11.</i> Promedio Temperatura de acuarios	35
<i>Figura 12.</i> Promedio pH de los acuarios	36
<i>Figura 13.</i> Promedio Conductividad Eléctrica de los acuarios	38
<i>Figura 14.</i> Promedio Oxígeno Disuelto de los acuarios.....	39
<i>Figura 15.</i> Sensibilidad en renacuajos de <i>Gastrotheca riobambae</i> durante el ensayo de toxicidad con su respectivo tratamiento.	41
<i>Figura 16.</i> Mortandad en las 8 semanas de ensayo con N-fosfometilglicina.....	44
<i>Figura 17.</i> Promedio mortalidad por tratamientos de N-fosfometilglicina	45
<i>Figura 18.</i> Resultados de la socialización de la investigación	46
<i>Figura 19.</i> Socialización de la investigación en la PUCESI	47



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas	54
Anexo 2. Medias de longitud cabeza - cola (tamaño).....	55
Anexo 3. Variables de control	56
Anexo 4. Mortalidad registrada de la <i>Gastrotheca riobambae</i> durante el ensayo	60
Anexo 5. Recolección muestras de suelo.....	61
Anexo 6. Resultados de muestras de suelo	62
Anexo 7. Protocolo determinación de N-fosfonometilglicina	63
Anexo 8. Dosis letal.....	65
Anexo 9. Resultados DL ₅₀ y DL ₁₀₀	66
Anexo 10. Resultados DL ₅₀ y DL ₁₀₀	67
Anexo 11. Invitación a la Socialización	68
Anexo 12. Socialización	69
Anexo 13. Lista de asistencia	70
Anexo 14. Encuestas.....	71
Anexo 15. Permiso del MAE.....	72

3. INTRODUCCIÓN

El N-fosfometilglicina es uno de los herbicidas más vendidos a nivel global (Steiner, Seitz, Wieczorek, Plotner, Isikveren y Hornung 2012), ya que cuenta con formulaciones comerciales como: Roundup, Rodeo, Rarger y Glyphos. Este compuesto no selectivo, que tiene efecto residual y es soluble en agua (Ministerio de Justicia y del Derecho, 2000), de acuerdo a sus características fisicoquímicas posee clase II de toxicidad, (moderada) en base a la categorización de la Agencia de Protección Ambiental (EPA), vale indicar que es el herbicida más utilizado para el control de plantas anuales y perennes, hierbas y otras especies herbáceas (Nivia, 2015).

Investigaciones realizadas en fase de laboratorio sobre la toxicidad del N-fosfometilglicina en anuros muestra que el herbicida tiene efectos directos e indirectos ya que puede ser de levemente a altamente tóxico, esto debido a que los anfibios son vulnerables a cambios ambientales (Relyea, 2005), además pueden intervenir otros factores como son el pH y disponibilidad de alimentación (Edginton, Sheridan, Stephenson, Thompson y Boermans, 2004). Otros estudios indican que el ingrediente activo no puede ser directamente tóxico, pero si los compuestos inertes que contiene, como es el caso de la polioxietilamina, que resultó más tóxica que la sal del glifosato en renacuajos (Henao, Triana y Bernal, 2014).

Su persistencia y degradación depende en el ambiente y tipo de vegetación, en el caso de sitios forestales puede persistir de 1 a 3 años, en lugares acuáticos puede permanecer de 12 a 60 días y en sedimentos de lagunas puede durar hasta un año todo esto en aplicación directa (Damalas y Eleftherohorinos, 2011).

En el Ecuador existe poca información sobre la realidad que viven los anfibios frente a los agroquímicos que se utilizan a diario, de tal forma que se toma como bioincador a la especie de rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*), es un anuro que presenta insuficientes investigaciones y se encuentra en peligro, de acuerdo a la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

La investigación busca, por medio de ensayos toxicológicos, determinar las dosis letales, DL₅₀ y DL₁₀₀ del herbicida N-fosfometilglicina en renacuajos de la rana *Gastrotheca riobambae*, bajo condiciones controladas.

3.1 Planteamiento del problema

El crecimiento demográfico acelerado ha incrementado la necesidad de producir mayor cantidad de alimentos en tiempos más cortos y evitar pérdidas de los mismos, por el cual los agricultores implementan métodos para tener un mejor rendimiento en sus cosechas. La falta de información y capacitación en el uso adecuado de agroquímicos ocasionan problemas al ambiente a corto, mediano y largo plazo, si bien los países desarrollados han disminuido su uso, los países tropicales siguen utilizando de forma intensiva, es necesario decir que solo el 0.1% del herbicida asperjado llega a la planta, lo restante circula por el ambiente contaminado suelo, agua y biota (Carvalho, Nhan, Zhong, Tavares y Klaine, 1998).

La contaminación de los cuerpos de agua ha ido en aumento por el herbicida N-fosfometilglicina ya que la mayoría de los agricultores de la comunidad La Espereza utilizan dicho compuesto para eliminar hiervas y malezas antes y durante el periodo de cultivo, si bien no se aplica directamente al suelo o cuerpos de agua, una parte de la concentración puede llegar al suelo (Haney, Franzluebbers, Porter, Hons, y Zuberer, 2004) y a través de la escorrentía puede llegar a los cuerpos de agua y contaminar aguas abajo por varios kilómetros (Environment, 1999).

La disminución de la diversidad de anfibios es aproximadamente de un 70%, ya que más del 86% de renacuajos mueren por encontrarse en charcas contaminadas con glifosato (Relyea, 2005) y si las aspersiones con glifosato siguen en aumento la extensión de los anfibios también será de una forma acelerada (Coloma y Frenkel, 2012).

3.2 Justificación

En vista de que los suelos y cuerpos de agua de la parroquia La Esperanza representa un medio de valiosa importancia para el desarrollo de algunas especies de anfibios como son *Gastrotheca orophylax*, *Pristimantis curtipes* y *Gastrotheca riobambae*, estos carecen de estudios de toxicidad de N-fosfonometilglicina en anuros, se realizó el estudio en la especie *Gastrotheca riobambae*, para determinar la tolerancia frente a este herbicida, además contribuir al conocimiento sobre el grado de toxicidad y el riesgo que presenta a la biodiversidad. Es importante destacar que dicha información será entregada a las instituciones pertinentes y pueda adoptar medidas sobre el manejo y uso adecuado del herbicida para mantener el cuidado y calidad de suelo y vida acuática.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad en renacuajos de la rana (*Gastrotheca riobambae*) en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina mediante un análisis de HPLC para determinación de dosis letal.

3.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar áreas específicas en las vertientes de la comunidad La Esperanza mediante una georreferenciación del lugar para la toma de muestras.
2. Analizar las diferentes muestras tomadas, mediante HPLC para determinación de las concentraciones en cada una de ellas.
3. Evaluar la toxicología de N-fosfonometilglicina en renacuajos de la especie de rana (*Gastrotheca riobambae*) para la determinación de la dosis letal.
4. Socializar la investigación a grupos relacionados a la conservación de la biodiversidad mediante la coordinación y colaboración de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra y el Ministerio del Ambiente para difundir la información generada.

3.4 Hipótesis

¿La concentración de N-fosfometilglicina en el agua, influye en la mortalidad y sensibilidad de la especie *Gastrotheca riobambae*?

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 Bioensayos

Los bioensayos son técnicas utilizadas para analizar el efecto de la contaminación sobre los componentes biológicos de sistemas acuáticos, a esto se llama bioensayos de ecotoxicidad. Un bioensayo se define “como una prueba donde un tejido vivo, un organismo o grupo de ellos, son empleados como reactivos ante un potencial tóxico de alguna sustancia fisiológicamente activa y en función desconocida, cuya actividad se desea investigar (Camiñas, 2002).

Los bioensayos permiten evaluar la toxicidad de una muestra sin conocer directamente la composición química, presentan la ventaja de ser económicos y obtener resultado rápido (De la Peña de Torres y Herrero, 2005), además son simples y se pueden emplear para monitoreo de causa efecto de tipo ambiental. La desventajas de este tipo de ensayo es generar resultados con información no específica de un compuesto ya que los organismos son sometidos a diferentes condiciones experimentales, en la cual incluye la muerte del individuo, pero es difícil determinar todas la causas de dicho efecto a través de un bioensayo (Castillo, 2004).

4.1.1 Clases de Bioensayo

Los ensayos pueden ser de dos tipos (Rocio, 2006).

4.1.1.1 Letales y agudo

Es la dosis que produce un efecto adverso a un grupo de organismos, durante un tiempo de exposición corto de 48 a 96 horas y la respuesta es letal la DL_{50} es la concentración toxica que causa la muerte del 50% de los organismos y la concentración total DL_{100} produce la muerte del 100% de los organismos expuestos (Peña, 2005).

4.1.1.2 Sub-letales o crónicas

Esta concentración no implica la muerte de los organismos en prueba. Por esta razón las pruebas de toxicidad crónica están dadas en función de la conducta, fecundidad, reproducción, crecimiento, desarrollo y bioacumulación (Peña, 2005).

4.1.2 Organismo de estudio


La especie de rana *Gastrotheca riobambae*. Esta especie fue seleccionada por encontrarse en zonas de cultivo asperjadas con N-fosfometilglicina, además es un anuro que según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) se encuentra en peligro en su estado de conservación, puede ser tolerante a cambios en su hábitat, posee una producción de renacuajos alta, ya que una hembra adulta pone 130 huevos aproximadamente.

4.2 Características del glifosato

El glifosato es un herbicida no selectivo, en 1970 investigadores de la empresa MONSANTO dieron a conocer su descubrimiento (Baird, Batson, Watson, y Hightower, 2004) . Sus características fisicoquímicas se detallan en la Tabla1. El N-fosfometilglicina es de clase II de toxicidad, de acuerdo a la categorización de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) su toxicidad es moderada por la cual funciona como un herbicida de uso general, además se usa para el control de plantas anuales y perennes, hierbas y otras especies herbáceas (Nivia, 2015).

Tabla 1.

Propiedades fisicoquímicas de N-fosfometilglicina

Nombre común (ISO)	Glifosato
Nombre químico (IUPAC)	N-fosfometilglicina
Pureza mínima	950g.kg ⁻¹
Formula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Masa molecular	169
Formula estructural	
Punto de fusión	189,5°C
Punto de ebullición	Descomposición
Apariencia	Cristal incoloro
Densidad relativa	1,075 kg.m ⁻³
Solubilidad en agua	10,5- 0,2 g.l ⁻¹
Flamabilidad	No altamente inflamable
Propiedades explosivas	No explosivo

Fuente : Elaboración propia .Tomado de (Ministerio de Justicia y del Derecho, 2000)

4.2.1 Presencia en el ambiente

4.2.1.1 Movilidad

Es poco móvil en el suelo por lo cual su degradación es lenta, por lo que puede filtrarse hacia agua subterráneas, su absorción depende del tipo de suelo. Si los suelos tienen menor contenido de óxido de hierro y alto contenido de cobre su absorción es menor (Bozzo, 2010), además algunos suelos liberan 15 %, otros el 80 % y hasta 100% de lo absorbido y a través de la escorrentía puede ir directamente hacia desagües y aguas superficiales. (Environment, 1999).

4.2.1.2 Persistencia

Su persistencia y degradación depende en el ambiente y tipo de vegetación, en el caso de sitios forestales puede persistir de 1 a 3 años, en lugares acuáticos puede permanecer de 12 a 60 días y en sedimentos de lagunas puede durar hasta un año si la aspersión es directa (Bozzo, 2010), diversos autores han mencionado que el glifosato tiene un efecto de inhibir el crecimiento de algunos parásitos (UNL, 2010), además en nematodos como lombrices, hongos y una variedad de especies microbianas (Ostera, Malanga y Puntarulo, 2016).

4.2.1.3 Toxicidad en sistemas acuáticos

Las investigaciones realizadas muestran que las concentraciones de N-fosfometilglicina pueden afectar a diferentes organismos acuáticos desde algas microscópicas, hasta peces y moluscos, uno de los efectos fue la muerte de gusanos acuáticos, cambios en las células de hepáticas de las carpas (*Cyprinus carpio*). En el caso de fitoplancton y perifiton muestran cambios en la estructura de población microbiana (Gill, Sethi, Mohan, Datta, y Girdhar, 2018), las comunidades microbianas marinas también se ven alteradas ya que el glifosato llega a través de escorrentías a las costas marinas (Stachowski, 2008). Este herbicida puede adherirse a partículas de suelo y ser tóxico y biodisponible para individuos que se alimentan por filtración, tal es el caso de moluscos y crustáceos (Bustos, 2012).

4.2.1.4 Toxicidad en anfibios

Los resultados de varios estudios sobre toxicidad indican que las especies que más se pierden son predadoras de plagas en cultivos agrícolas y forestales, esta pérdida genera impactos significativos, ya que las plagas bajan el rendimiento y calidad de cultivos (Relyea, 2005).

La disminución de las especies de anfibios alrededor del mundo es alta, se estima que una de cada tres especies está en peligro de extinción (Williams, Kroes, y Munro, 2000). Las

causas son la pérdida, fragmentación de hábitats, enfermedades y contaminación ambiental (Relyea, 2005).

Los efectos que genera este herbicida son malformaciones morfológicas externas (craneofaciales, bucales, en los ojos y curvatura de la aleta caudal), además de alteraciones en la estructura cartilaginosa por disrupción en la formación de colágeno y daños en el esqueleto hiobranquial (Arboleda, Solano, Romero y Gómez, 2000).

4.3 Descripción de (*Gastrotheca riobambae*)

4.3.1 Características generales

La rana marsupial andina se encuentra distribuida en los andes de Sudamérica (Duellman, 1987), a nivel del Ecuador se distribuye en los bosques y valles interandinos de las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Chimborazo(Coloma y Frenkel, 2012). Es una rana que puede encontrarse junto a fuentes de agua como pozas, lagunas, riachuelos, y suelos pantanosos (Merino y Coloma, 2005). Las hembras adultas pueden diferenciarse de los machos porque tiene una bolsa en su espalda para incubar a sus crías denominado marsupio (Moya, Alarcón, y del Pino, 2007)La alimentación en estado de renacuajos es de material vegetal y los adultos consumen de pequeños invertebrados (Coloma y Frenkel, 2012).

4.3.2 Taxonomía

Tabla 2.

Descripción taxonómica de la rana marsupial andina (Gastrotheca riobambae)

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Gnathostomata
Clase	Amphibia
Orden	Anura
Suborden	Neobatrachia
Familia	Hemiphractidae
Género	Gastrotheca
Especie	<i>Gastrotheca Riobambae</i>

Fuente: Elaboración propia. Tomado de (Duellman, 1987)

4.3.3 Estructura biológica

En etapa de renacuajos presentan una piel lisa de color oscuro. En etapa juvenil y adulta los colores dominantes son el verde y café claro, los machos pueden llegar a medir entre 5,6cm siendo más pequeños que las hembras, ya que ellas pueden medir 6,6 cm de longitud rostro-cloacal (Duellman, 1987).

Su cuerpo robusto puede dividirse en dos partes cabeza y tronco, la boca es grande que se extiende por toda su cabeza ancha. La abertura cloacal está ubicada en extremo caudal del cuerpo. Además como toda rana posee extremidades posteriores más largas que las anteriores, importante para facilitar el salto (Coloma y Frenkel, 2012).

4.3.4 Alimentación

Son omnívoros ya que en etapa de renacuajos se alimentan de algas y materia orgánica y en su etapa adulta puede alimentarse de mosquitos, plagas de cultivos y hasta lombrices. (Coloma y Frenkel, 2012).

4.3.5 Madurez sexual

La madurez sexual puede alcanzar entre los 7 y 8 meses (Duellman y Maness, 1980) vale indicar que esto depende de las condiciones nutricionales y ambientales favorables, como: influencia de la lluvia, temperatura y luminosidad (Michaels, Downie y Campbell-Palmer, 2014).

4.3.6 Reproducción

El macho fecunda los huevos después de que la hembra libera los huevos, introduciéndolos con sus patas traseras en el marsupio de la hembra. Dentro de esta cavidad cada huevo tiene su propia membrana protectora que permite en intercambio de nutrientes.

La madre transporta entre 100 y 130 embriones en un periodo de 60 a 120 días hasta la eclosión de renacuajos (Villota y Duellman, 2012) cada huevo mide 3mm de diámetro, la madre extrae uno a uno con sus patas traseras. Los renacuajos recién salidos branquias que les permite respirar, además su metamorfosis se cumple durante 3 meses donde las ranas ya pueden salir del agua hacia la vida terrestre (Duellman, 1987).

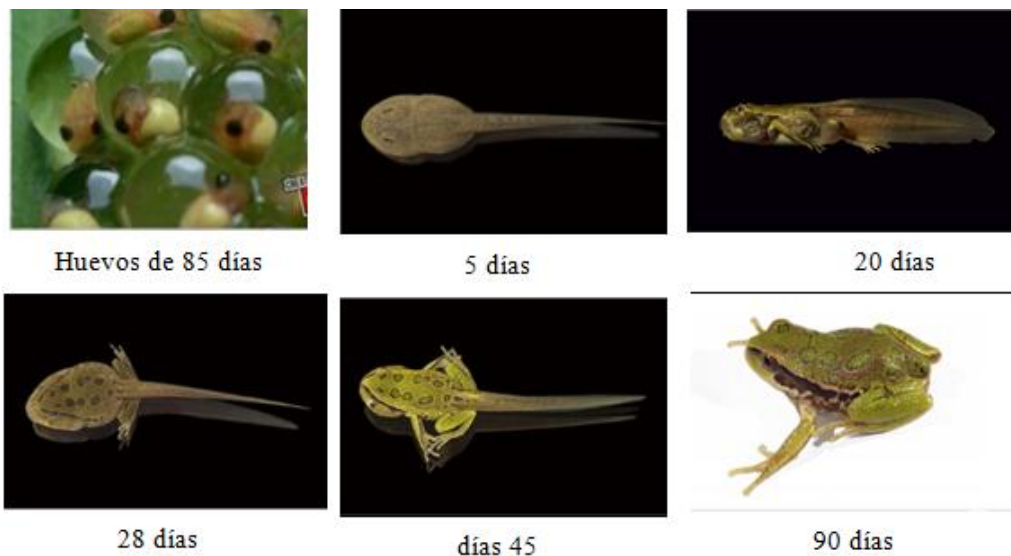


Figura 1. Metamorfosis de la rana *Gastrotheca riobambae*
Fuente: Elaboración propia. Tomado de (Coloma, 2008)

4.3.7 Requerimientos ambientales

4.3.7.1 Agua

El agua es un factor importante en la reproducción de la rana marsupial andina, ya que ellos no la toman, sino que la absorben a través de su piel permeable con una parte de oxígeno que les ayuda a no sofocarse.

El Ecuador al tener estaciones secas donde el agua y alimentos son más escasos, este tipo de especies entran en una etapa de sueño estival que es semejante a la hibernación que puede ayudar ahorrar energías y sobrevivir a la sequía, además de ocultan en madrigueras subterráneas frescas y húmedas, desarrollando una capa de piel gruesa para atrapar la humedad y ayudar a la reparación (Michaels et al., 2014).

4.3.7.2 Humedad

Este factor es importante porque ayuda a estimular los comportamientos reproductivos, sin necesidad de tener fuertes lluvias, además favorece a la respiración de la especie. (Alexander y Eischeid, 2001).

4.3.7.3 Temperatura

La rana marsupial andina se encuentra mayormente distribuida en bosques o lugares templados a una temperatura de 18°C a 24°C, siendo este rango ideal para los procesos reproductivos de crecimiento de la especie (Michaels, Downie y Campbell-Palmer 2014).

4.3.7.4 Luz

Este factor ayuda en procesos metabólicos, construcción de tejidos, desarrollo y fortalecimiento óseo. Además, incide en el comportamiento y reproducción (Alexander y Eischeid, 2001).

4.3.8 Valor comercial

No posee valor comercial industrial, alimenticio, farmacéutico o comercialización para acuaterarios, su especie se ha visto afectada por la pérdida de hábitat y no por valores comerciales (Alexander y Eischeid, 2001).

4.3.9 Estudios de toxicidad en la rana marsupial andina como bioindicador

En las investigaciones realizadas la rana marsupial andina no tiene registros como bioindicador pero hay investigaciones con respecto a manejo, crianza, estado poblacional de la especie y distribución de la misma.

Una investigación realizó la evaluación del ciclo reproductivo de la *Gastrotheca riobambae*, en el Centro Experimental Académico Salache de la Universidad de Cotopaxi generando resultados de comportamiento, cortejo, periodo de incubación, además de establecer una población viable para la conservación de la especie, esta investigación estuvo encabezada por Paola Pacheco como postulante, previo a la obtención del título médico veterinario y zootecnista, en la ciudad de Latacunga Ecuador (Pacheco, 2015).

La Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador llevó a cabo la investigación del estado poblacional y relaciones ecológicas de *Gastrotheca riobambae* en dos localidades del volcán Pasochoa en la provincia de Pichincha, con el objetivo de capturar la especie y verificar cuántos individuos se obtiene por cada kilómetro cuadro en época lluviosa y verificar el estado de conservación que se encuentra la rana marsupial andina. El trabajo inicio en 2009 por un grupo de cuatro investigadores (Ramirez y Rodriguez, 2011).

En el 2013 un grupo de investigadores del Departamento de Biología de la Universidad de Tolima-Colombia realizan un estudio de laboratorio de efectos letales y subletales del glifosato en embriones de anuros colombianos , *Engystomops pustulosus*, *Rhinella humboldti*, *Rhinella marina* y *Hypsiboas crepitans* con el objetivo de determinar la DL₅₀, obteniendo resultados que la especie *Engystomops pustulosus* es más tolerante a una concentración DL₅₀ 3033,18ug.l⁻¹ y la más sensible fue *Rhinella marina* CL₅₀ 1421,46ug.l⁻¹. Los efectos de las concentraciones fueron una reducción significativa de tamaño corporal y retraso en el desarrollo de los embriones.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Características del área en estudio



Figura 2. Parroquia La Esperanza

Fuente: Google Earth, 2017.

Elaborado por: El autor

Tabla 3.

Datos generales de la parroquia La Esperanza

Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Parroquia	La Esperanza
Altitud	2430 m.s.n.m
Temperatura	16 °C
Precipitación	758,6mm
Humedad relativa	74%
Población	7363 habitantes

Fuente: Elaboración propia. Tomado de GAD parroquial La Esperanza, 2015

5.2 Materiales

5.2.1 Materias primas

- Alimento para renacuajos (Algas filamentosas marrón y semillas de *Callistemon citrinus*)

5.2.2 Materiales

- Botellas plásticas
- Peceras de vidrio
- Guantes quirúrgicos
- Micro pipetas de 100ul y 1000ul
- Vasos de precipitación
- Cubeta de 10ml
- Calibrador
- Linterna

5.2.3 Equipos

- Potenciómetro
- Oxímetro
- Conductímetro
- Equipo HPLC

- Computadora
- Cámara

5.2.4 Reactivos

- N-fosfonometilglicina

5.2.5 Otros

- Libreta de apuntes
- Mandil
- Esferos

5.3 Tipo de investigación

Esta investigación fue de tipo descriptiva y experimental.

5.3.1 Investigación descriptiva

En ella se plasma las características o rasgos que presenta el objeto en estudio (Avila, 2006)

Por medio de esta investigación se describió las características que presentaba. Los renacuajos de *Gastrotheca riobambae* sometidos a diferentes dosis de N-fosfonometilglicina.

5.3.2 Investigación experimental

Esta investigación tiene como finalidad determinar la causa y efecto de variables o factores experimentales y utiliza sistemas aleatorios para la selección de muestras (Avila, 2006)

En el ensayo se manejaron tres dosis experimentales que no han sido probadas en condiciones controladas con anterioridad y de este modo se describe lo que produce en cada uno de los renacuajos.

5.4 Metodología

5.4.1 Técnicas

5.4.1.1 Observación

Es una técnica fundamental para observar con atención el fenómeno y tomar esa información para su posterior análisis (Kawulich, 2005) Se observó la sensibilidad y mortalidad de los renacuajos en cada uno de los tratamientos al ser sometidos a diferente dosis de N-fosfonometilglicina.

5.5 Manejo y análisis de datos

5.5.1 Variables

5.5.1.1 Independientes: Dosis de N-fosfonometilglicina

Tabla 4.

Variable independiente

Dosis de N-fosfonometilglicina	
Alta	576mg/l
Media	288mg/l
Baja	144mg/l

Fuente: El autor

Las dosis iniciales de cada uno de los tratamientos (alta, media y baja) que se presenta en la Tabla 4, fueron tomadas de estudios similares realizados en Colombia por Henao, Vásquez y Bautista en el 2014, la cual fueron dosis letales DL₅₀ en especies de anfibios.

5.5.1.2 Variable dependiente

- Porcentaje de mortalidad
- Sensibilidad

5.5.1.3 Variables de control

- pH
- Conductividad
- Temperatura
- Oxígeno disuelto

5.5.2 Análisis estadístico

Tabla 5.

Diseño experimental (DCA)

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
R1	T1R1	T2R1	T3R1	T4R1
RII	T1RII	T2RII	T3RII	T4RII
RIII	T1RIII	T2RIII	T3RIII	T4RIII

Fuente: El autor

Para el desarrollo del diseño experimental, se implementaron 12 acuarios de cristal que contenían 8 renacuajos de *Gastrotheca riobambae* independientemente, además los acuarios tenían forma ovalada de 20cm de diámetro con una capacidad de 2 litros cada uno, fueron acoplados con agua de reservorio, algas y semillas de cepillo chino simulando un reservorio natural para renacuajos.

Los análisis se realizaron en el programa estadístico R (versión 3.2.3). Este bioensayo de toxicidad se evaluó en tres concentraciones más el testigo con tres repeticiones, es decir con 12 unidades experimentales en un diseño completamente al azar (DCA), la eficacia de los tratamientos se evaluó a través de un análisis de varianza (ADEVA) y prueba de significancia Tukey 5%.

5.6 Manejo del ensayo

5.6.1 Caracterización del suelo de la parroquia La Esperanza

Para el análisis físico-químico de tomaron tres muestras de suelo de tres puntos diferentes de suelos agrícolas.

5.6.1.1 Toma de muestras

5.6.1.1.1 Muestra de suelo

- Para la recolección de muestras de suelo destinadas al análisis de glifosato se realizó lo siguiente:
- Reconocimiento de suelos de agrícolas que estén aledaños de las vertientes de la parroquia la Esperanza.
- Toma de la muestra de suelo con un barreno y puesta en fundas, además todas las muestras fueron etiquetadas y transportadas al laboratorio como se muestra en la Figura 3.
- Las muestras fueron tomadas de suelos removidos para siembra, de cultivo de maíz y cebada.
- Previo al análisis para determinar la concentración de N-fosfonometilglicina en las muestras de suelo se evaluaron los siguientes parámetros: humedad, textura, densidad, materia orgánica, pH y conductividad eléctrica como se muestra en la Tabla 6.



Figura 3. Toma de muestras de suelos parroquia La Esperanza
Fuente: El autor

En la Tabla 6 se muestra la evaluación de 7 parámetros (humedad, textura, densidad aparente, materia orgánica pH y conductividad eléctrica) en las muestras de suelo previo al análisis de N- fosfonometilglicina.

Tabla 6.

Parámetros de las muestras de suelo

Ítem	Muestras valores			Método
	M1	M2	M3	
Humedad	22 %	20 %	18 %	Gravimétrico
Textura	30 % arena, 19 % limo, 51 % arcilla.	28 % arena, 21 % limo, 51 % arcilla.	24 % arena, 26 % limo, 50 % arcilla.	Textural – Bouyoucus.
Densidad aparente	1,19 g.cm ⁻³	1,09 g.cm ⁻³	0,95 g.cm ⁻³	Psl 202
Materia Orgánica	2,2 %	2,7%	1,9%	Walkley-Black
pH	7,01	6,42	5,95	
Conductividad eléctrica	0,16 ms.cm ⁻¹	0,06 ms.cm ⁻¹	0,11 ms.cm ⁻¹	Potenciómetro Conductímetro de sonda

Fuente: Datos de Laboratorio
Elaborado por: El autor

5.6.2 Análisis de muestras

Las concentraciones de N-fosfometilglicina encontradas en las diferentes muestras de suelo se analizaron por HPLC.

5.6.3 Preparación de muestra de suelo

- Las muestras de suelo fueron tratadas biofísicamente por el protocolo PSL-113. En tubos de propileno de 15 ml, se procede a mezclar 0,1 g de suelo más 4 ml de tetraborato de sodio $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, agitándolas 60 min, para luego centrifugar a 4000 rpm por 15 min. Posteriormente el sobrenadante se procede a derivar.
- De las muestras procesadas se toman 300 μl de la solución sobrenadante y se incuban con 228 μl de NQS $0,03 \text{ mol.l}^{-1}$ en HCl $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$. 60 μl de estándar interno de 4-aminoantipirina 100 mg.l^{-1} , aforado a 1 ml con una solución de tetraborato de sodio $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$. Con ajuste de pH a 9,4. Esta mezcla se tiene que incubar en un baño termostatado 60°C por 5 min. Una vez frío, se adicionan 60 μl de HCl $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$, para direccionar compuestos neutros. La solución se filtra con acetato de celulosa $0,45 \mu\text{m}$ y finalmente se inyecta en un sistema cromatográfico.

5.6.4 Estándar de medición

Tabla 7.

Técnica aplicada para análisis de N-fosfometilglicina en suelo por HPLC

Columna	C18
Bomba	PU-2089
Horno de columna	CO-2067
Detector UV	(UV-2070)
Modo de bomba	LPG1
Temperatura de la columna	$23-25^\circ \text{C}$
Volumen de inyección	20 μl
Tiempo de retención	10 min
Detectores	UV 217 nm

Fuente: Elaboración propia. Tomada de (Rodríguez, Guerrero y Castro, 2002)

5.6.5 Operación del cromatográfico

Preparar varias concentraciones a partir de un estándar del glifosato de 100 ppm; siendo ésta la solución madre, así se obtuvo soluciones de 50, 25 y 10 mg.l⁻¹, empleadas para la curva de calibración estándar.

Las muestras se analizan con cromatografía de líquidos CL (PerkinElmer MA, USA), UV-Vis a 217 nm. Conectado a un inyector manual con un loop externo de 20 µl, con una columna C-18 como fase estacionaria. La fase móvil es 1% de ácido acético-metanol (60:40 v/v) a un flujo de 1 ml/min, a temperatura de 23-25°C.

5.6.6 Adecuación de acuarios

Se implementó un total de 12 recipientes de vidrio que fueron adecuados para colocar renacuajos de la especie *Gastrotheca riobambae*, a cada una se colocó dos litros de agua, de reservorio y algas como se muestra en la Figura 4, para equilibrar el cambio de hábitat.



Figura 4. Adecuación acuarios
Fuente: El autor

5.6.7 Captura de renacuajos

La muestra de renacuajos destinados al análisis toxicológico del glifosato (N-fosfometilglicina) se realizó lo siguiente:

- Se realizó la captura por manipulación directa.
- Un total de 96 especímenes capturados, previamente fueron colocados en una cubeta de 10 litros con agua del lugar donde se los encontró como se muestra en la Figura 5.
- Fueron transportados al laboratorio y colocados en los acuarios
- Antes de ser colocados en los acuarios se tomó la medida de longitud cabeza- cola como se muestra en la Figura 6.



Figura 5. Captura de renacuajos
Fuente: El autor



Figura 6. Toma de medidas de renacuajos
Fuente: El autor

5.6.8 Colocación de los renacuajos en los acuarios

La colocación de los renacuajos fue homogénea, un total de 96 individuos distribuidos en 12 acuarios, cada uno con un total de 8 especímenes.

5.6.9 Suministro de alimento

El suministro de alimento fue cada tres días, con algas y semillas de *Callistemon citrinus* del reservorio de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, durante los 7 días de aclimatación y las ocho semanas de ensayo, además de medir parámetros, temperatura, pH, oxígeno disuelto, y conductividad eléctrica.

5.6.10 Colocación de N-fosfonometilglicina

El suministro de la dosis de N-fosfonometilglicina fue a las ocho de la mañana cada 7 días iniciando con dosis base que fueron: 144mg.l⁻¹ (dosis baja), 288mg.l⁻¹ (dosis media) y 576 mg.l⁻¹ (dosis alta) a la siguiente semana fueron duplicadas cada una de las dosis, hasta alcanzar la dosis letal de DL50 y DL₁₀₀.

5.6.11 Parámetros evaluados

5.6.11.1 Temperatura y pH

Parámetro medido antes de las duplicaciones N-fosfonometilglicina durante y después. El equipo utilizado fue el potenciómetro: modelo pH 5 plus, LaMotte, con lectura directa de ISE (electrodos de ión selectivo), de rango 0 a 14 pH como se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Potenciómetro
Fuente: El autor

- La pared del potenciómetro se lavó con agua destilada previo a la lectura y al finalizar el procedimiento
- Se midieron las concentraciones de pH y temperatura directamente de los acuarios, esperando que se estabilice el valor para poder tomar los datos.

5.6.11.2 Conductividad eléctrica

Parámetro medido antes de las duplicaciones de glifosato durante y después. El equipo utilizado fue el Conductímetro: Modelo CON 6 plus, LaMotte, con lectura directa de rango 0 a 199,9 us.cm^{-1}



Figura 8. Conductímetro
Fuente: El autor

- Se lavó las paredes del conductímetro con agua destilada previo a la lectura y al finalizar el procedimiento
- Las concentraciones de conductividad eléctrica fueron tomadas directamente de las peceras, esperando que se estabilice el valor para poder anotar los datos.

5.6.11.3 Oxígeno disuelto

Parámetro medido antes de las duplicaciones glifosato durante y después. El equipo utilizado fue el oxímetro. Modelo pro20, YSI, de rango 0 a 50 mg.l⁻¹ como indica la Figura 9.



Figura 9. Oxímetro
Fuente: El autor

- Se comprobó que el equipo este calibrado, para tener lecturas exactas.
- Antes y después de la toma de datos se lavó las paredes del oxímetro con agua destilada para no alterar los valores
- La concentración de oxígeno se tomó directamente de las peceras, esperando que se estabilice el valor y anotar los datos obtenidos.

5.7 Determinación de la DL₅₀ y DL₁₀₀ por HPLC en agua

Una vez terminado el ensayo se realizó el análisis del N-fosfonometilglicina en agua, para determinar la concentración DL₅₀ y DL₁₀₀, por HPLC y verificar si hay diferencia con los resultados de la dosis acumulada.

5.7.1 Toma de muestras

Se tomó 250ml de agua en envases plásticos de los diferentes acuarios, se etiqueto y se llevó a laboratorio para su análisis.

5.7.2 Preparación de muestras

Se tomó los 250ml de agua de las dosis DL₅₀ y DL₁₀₀ de N-fosfonometilglicina y se filtró dos veces, dejando preparada la muestra para ser corrida en el equipo HPLC.

5.7.3 Técnica aplicada

Tabla 8.

Técnica aplicada para análisis de N-fosfonometilglicina en agua por HPL

Columna	C18
Bomba	PU-2089
Horno de columna	CO-2067
Detector UV	(UV-2070)
Modo de bomba	LPG1
Temperatura de la columna	23-25 ° C
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo de retención	10 min
Detectores	UV 217 nm

Fuente: Elaboración propia. Tomado de (Rodríguez, H.; Guerrero, J. y Castro, 2002)

5.7.4 Procedimiento cromatográfico

Las muestras se analizan con cromatografía de líquidos CL (PerkinElmer MA, USA), UV-Vis a 217 nm. Conectado a un inyector manual con un loop externo de 20 µl, con una columna C-18 como fase estacionaria. La fase móvil es 1% de ácido acético-metanol (60:40 v/v) a un flujo de 1 ml/min, a temperatura de 23-25°C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Georreferenciación de los puntos de muestro en la parroquia La Esperanza

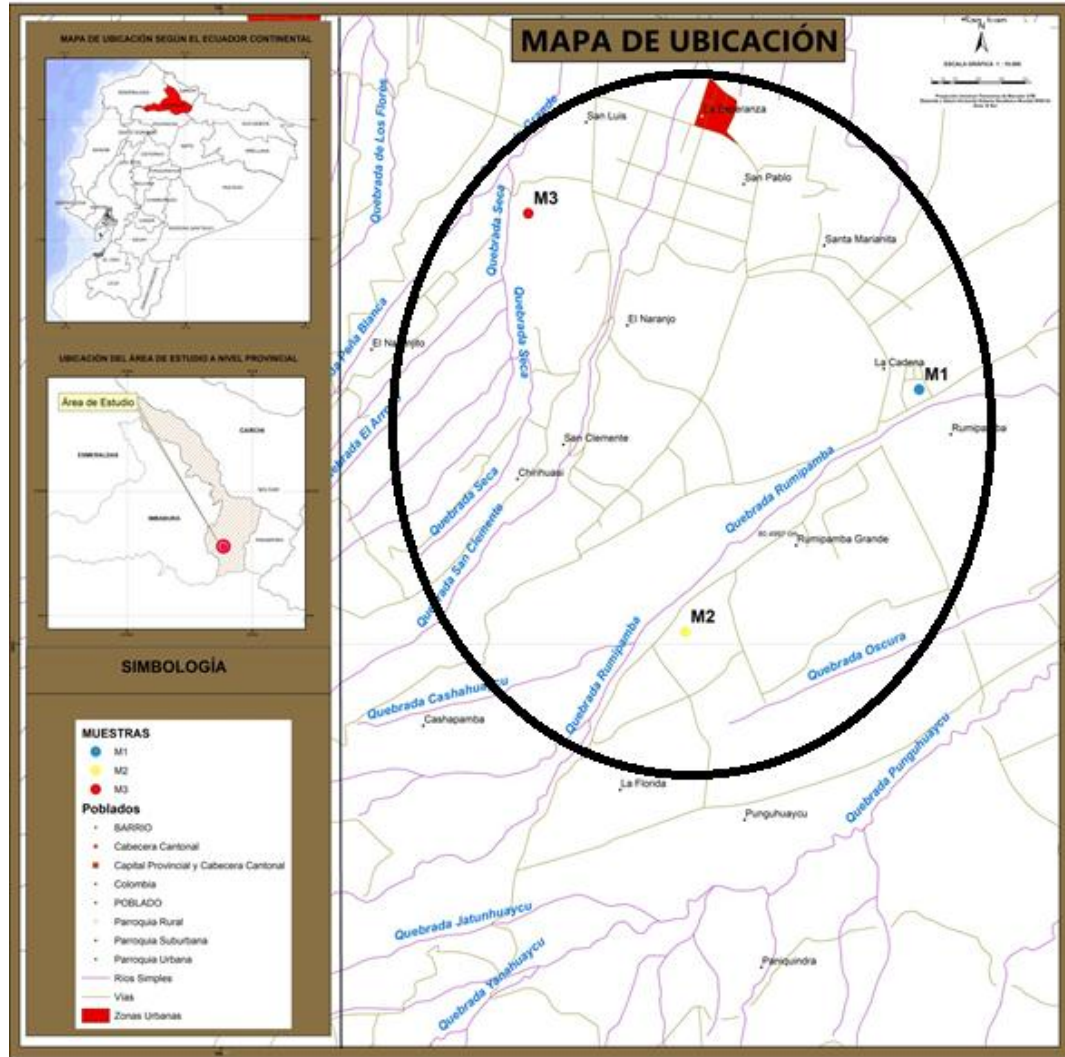


Figura 10. Puntos de recolección de muestras
Fuente: El autor

6.2 Determinación de N-fosfometilglicina en las muestras de suelo

Tabla 9.

Concentración de N-fosfometilglicina en muestras de suelo

Herbicida	Concentración en suelo		
	M1	M2	M3
N-fosfometilglicina	0,4mg.kg ⁻¹	0,0mg.kg ⁻¹	0,01mg.kg ⁻¹

Fuente: Datos de laboratorio

Elaborado por: El autor

Nota:

- M1:P1 remoción de suelo para siembra
- M2:P2 cultivo de maíz
- M3:P3 cultivo de cebada

Los resultados fueron obtenidos a través del laboratorio Biociencia de la ciudad de Quito (Anexo 6), los análisis biofísicos parciales de suelo, son los que están definidos por la humedad, textura, contenido de materia orgánica, pH y conductividad eléctrica. Donde la densidad de esta describe la cantidad de agua y oxígeno, además determinando las concentraciones de hierro, aluminio, calcio, los cuales infieren en la concentración de N-fosfometilglicina, esto debido a que el N-fosfometilglicina inmoviliza a los micronutrientes que actúan como cofactores de enzimas de la planta en diferentes procesos fisiológicos, Los análisis biofísicos de suelo, evidencian una alta actividad microbiana, los cuales se reflejan en una alta tasa de respiración de suelo que ayudan a la presencia de *Pseudomonas spp* el cual actúa como catalizador de la principal molécula contenida en los análisis como se muestra el Anexo.6

6.3 Tamaño de los renacuajos

La *Gastrotheca riobambae* cumple su metamorfosis en noventa días (Villota y Duellman, 2012), si bien la investigación inicio con renacuajos de cinco días de eclosión con un tamaño corporal de 17,63mm durante las ocho semanas de ensayo obtuvieron un crecimiento de 4,45mm obteniendo un tamaño final de 22,08mm, esto debido que el N-fosfometilglicina puede generar estrés fisiológico que afecta la velocidad de crecimiento y metamorfosis (Relyea, 2005).

6.4 Evaluación de la dosis letal de N-fosfometilglicina

En la Tabla 10 se muestra las dosis suministradas cada 7 días hasta llegar a la dosis letal, tomando como base tres dosis iniciales ,144mg.l⁻¹, 288 mg.l⁻¹ y 576mg.l⁻¹, el ensayo tuvo una duración de 8 semanas, más la semana de adaptación.

Las dosis iniciales de cada uno de los tratamientos fueron tomadas de estudios similares realizados en Colombia por Henao, Vásquez y Bautista en el 2014, la cual resultaron ser dosis letales (DL₅₀) para embriones de anuros. En el estudio presente se muestran las concentraciones de glifosato cada semana y la mortalidad de los ejemplares.

La sexta semana la dosis letal (DL₅₀) en el tratamiento 3 (dosis alta) alcanza una mortalidad de 5 ejemplares en la repetición 1, en la repetición 2 y 3 hubo la muerte de 4 ejemplares, con una concentración de 7488mg.l⁻¹, a la octava semana se llegó a la dosis letal (DL₁₀₀) con la mortalidad total de los ejemplares con una concentración de 9792 mg.l⁻¹, además los tratamientos 1 y 2 no presenta la muerte total de sus ejemplares ya que resultaron menos vulnerables a concentraciones bajas de N- fosfometilglicina.

Tabla 10 .

Determinación de la Dosis Letal (DL50 y DL100) acumulada en función de las concentraciones de N-fosfometilglicina

Tratamientos															
Repeticiones	T1			Dosis Baja (mg/l)	T2			Dosis Media (mg/l)	T3			Dosis Alta (mg/l)	Testigo		
	I	II	III		I	II	III		I	II	III		I	II	III
Aclimatación	*	*	*		*	*	*		*	*	*		*	*	*
Sem1	0	0	0	144	0	0	0	288	0	0	0	576	0	0	0
Sem2	0	0	0	576	0	0	0	1152	0	0	0	2304	0	0	0
Sem3	0	0	0	864	0	0	0	1728	0	0	0	3456	0	0	0
Sem4	0	0	0	1152	0	0	0	2304	0	0	0	4608	0	0	0
Sem5	0	0	0	1584	0	0	0	3168	0	0	0	6336	0	0	0
Sem6	0	0	0	1872	1	0	0	3744	5	4	4	7488	0	0	0
Sem7	1	0	1	2160	2	2	1	4320	0	0	1	8640	0	0	0
Sem8	3	3	3	2448	3	4	3	4896	3	4	3	9792	0	0	0

Nota: * aclimatación de 7 días en todos los tratamientos

DL50: 7488mg/l

DL100: 9792mg/l

Fuente: Datos de laboratorio

Elaborado por: El autor

6.5 Variables de control

Se realizó el seguimiento de algunas variables de control para determinar si también intervienen en la acumulación y toxicidad del herbicida N-fosfometilglicina, durante la aclimatación y mortalidad de los individuos los parámetros son los siguientes.

6.5.1 Temperatura (°C)

Para la evaluación de este parámetro se utilizó un termómetro y los datos fueron tomados a temperatura ambiente del laboratorio.

Tabla 11.

Valores de Temperatura en función de las concentraciones de N-fosfometilglicina

Dosis	Temperatura (°C) \bar{X}
Baja	19,51
Media	19,50
Alta	19,61
Testigo	19,48

Fuente: Datos de laboratorio
Elaborado por: El autor

En la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos de temperatura en los diferentes tratamientos tomados durante el ensayo, además se presenta líneas de tendencia (Figura 11), las temperaturas oscilan entre 19,48 °C a 19,6 °C que son tolerantes para los renacuajos.

Por ser una rana marsupial andina está presente en bosques o lugares templados a una temperatura de 18°C a 24°C, siendo este rango ideal para los procesos reproductivos de crecimiento de la especie (Alexander y Eischeid, 2001), la temperatura promedio en la fase de laboratorio entra en rango ideal para la reproducción y crecimiento de la especie.

La acción del glifosato está marcada a un rango de temperatura de 15°C a 30°C, si es muy alta la temperatura puede resultar más toxico y a menor temperatura su difusión tarda varios días en su eficacia (Bozzo, 2010) si bien en la investigación no se busca la eficacia del glifosato pero fue de importancia tener un temperatura controlada para no tener datos erróneos en los resultados finales y poder demostrar los objetivos plateados en cuanto a la toxicidad del glifosato.

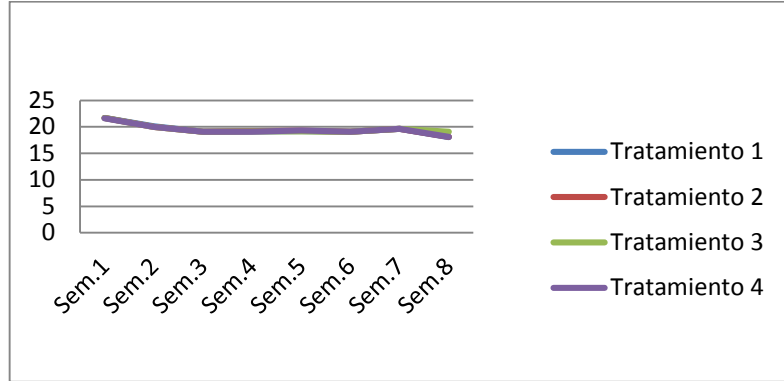


Figura 11. Promedio Temperatura de acuarios
Elaborado por: El autor

6.5.2 pH

Parámetro evaluado por un potenciómetro durante todo el ensayo

Tabla 12.

Valores pH en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina

Dosis	pH \bar{X}
Baja	6,88
Media	6,50
Alta	6,38
Testigo	7,05

Fuente: Datos de laboratorio
Elaborado por: El autor

En la Tabla 12 se detallan los resultados obtenidos de pH en los diferentes tratamientos medidos durante el ensayo, además se represente en líneas de tendencia (Figura 12). Las concentraciones promedio de pH oscilan entre 6,38 y 7,05 es un rango adecuado para el desarrollo de la vida de renacuajos, (Gill, Sethi, Mohan, Datta y Girdhar 2018),

El N-fosfonometilglicina presenta un pH de 4,4 a 4,9 puede influir en la calidad del agua por adición de aditivos obteniendo un pH de 2 o 9, además las aguas duras también influyen el pH del glifosato, (UNL, 2010). El agua que se tomó para investigación es un agua buena presento una conductiva eléctrica de 532 us.cm^{-1} y un pH 7,8 rangos importantes para el desarrollo del ensayo.

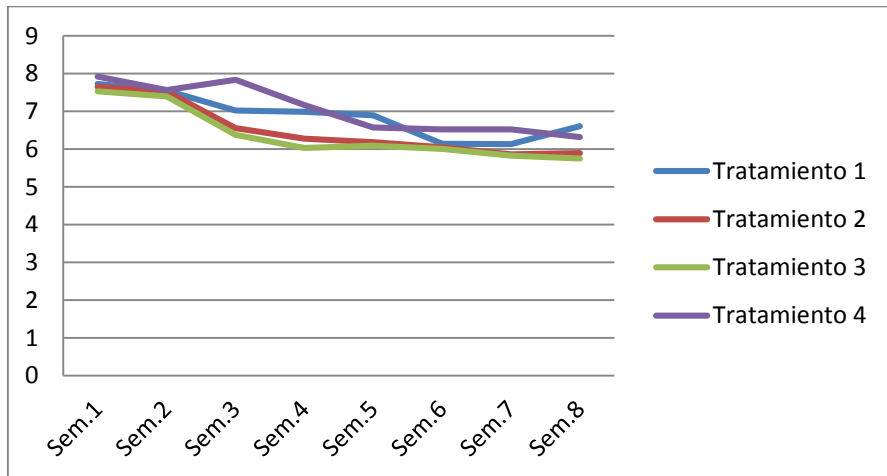


Figura 12. Promedio pH de los acuarios
Elaborador por: El autor

6.5.3 Conductividad eléctrica

Tabla 13.

Valores de Conductividad Eléctrica en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina

Dosis	Conductividad eléctrica (us.cm ⁻¹) \bar{X}
Baja	2585,54
Media	4184,87
Alta	6407,67
Testigo	659,46

Fuente: Datos de laboratorio
Elaborado por: El autor

En Tabla 13 se presenta resultados obtenidos de conductividad eléctrica durante el ensayo (adaptación y mortalidad), al mismo tiempo estos resultados son representados en líneas de tendencia (Figura 13). Las concentraciones promedio oscilan entre 659,46 us.cm⁻¹ y 6407,67 us.cm⁻¹ se puede decir que el primer valor aún es aceptable para el desarrollo de vida de los renacuajos, pero el segundo valor es muy alto y sería un problema para el desarrollo de vida acuática en general.

En caso del tratamiento 3 los acuarios contaban con una conductividad eléctrica inicial de 530 us.cm⁻¹, la cual es normal en calidad de agua de estanques y acuarios, al final del ensayo se obtuvo una conductividad eléctrica de 15916,67 us.cm⁻¹ la cual es muy alta y de acuerdo a la normativa de calidad de aguas (TULSMA) libro VI, anexo I. no es posible desarrollar vida de flora y fauna por esta razón la octava semana de haber iniciado el ensayo la mortalidad total de los renacuajo fue evidente.

En la segunda semana se observó un aumento la conductividad eléctrica por la adición de dosis de N-fosfonometilglicina en todos los tratamientos, esto por la disociación de sus tres grupos ácidos a excepción del testigo que mantenía un dato constante.

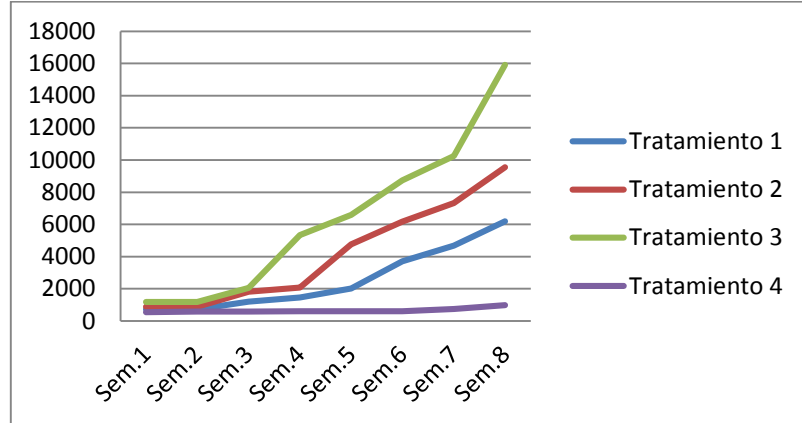


Figura 13. Promedio Conductividad Eléctrica de los acuarios

Elaborado por: El autor

6.5.4 Oxígeno disuelto

Tabla 14.

Valores de oxígeno disuelto en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina

Dosis	Oxígeno disuelto mg.l ⁻¹ \bar{X}
Baja	5,10
Media	5,12
Alta	5,15
Testigo	5,23

Fuente: Datos de laboratorio
Elaborado por: El autor

En la Tabla 14 se presenta los resultados obtenidos del oxígeno disuelto en los diferentes tratamientos durante el ensayo (adaptación y mortalidad) al mismo tiempo se representa los valores en líneas de tendencia (Figura 14).

El oxígeno disuelto inicial fue de 7,5 mg.l⁻¹, al término de la investigación las concentraciones del oxígeno disuelto cuentan con un rango promedio de 5,10 mg.l⁻¹ a 5,23 mg.l⁻¹

La concentración de oxígeno disuelto disminuyo con el paso de los días, lo cual podría atribuirse a que no hubo una renovación de agua, aeración continua de los acuarios y crecimiento de los renacuajos. Por otra parte la colocación de algas como alimento también implica en la disminución de la concentración de oxígeno y por esta razón se puede decir que la disminución del oxígeno disuelto no está directamente ligada a las concentraciones de glifosato (Triana-Velasquez, Rojas, y Bautista, 2013).

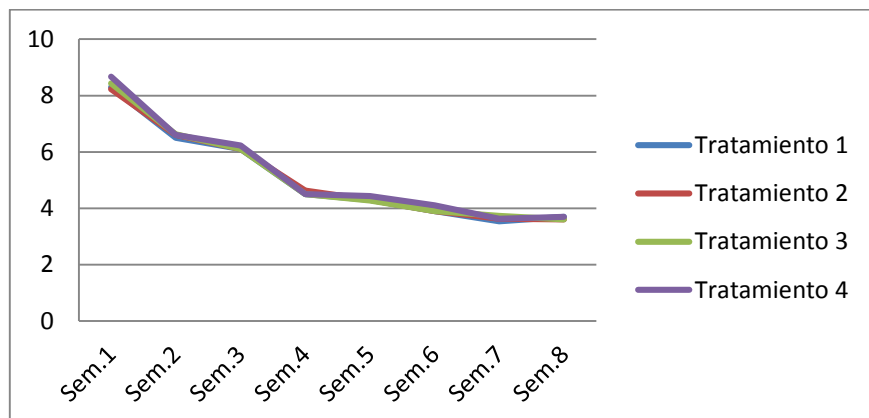


Figura 14. Promedio Oxígeno Disuelto de los acuarios
Elaborado por: El autor.

6.6 Determinación de la DL₅₀ DL₁₀₀ por HPLC

En la Tabla 15 se presenta los resultados obtenidos en porcentaje después de hacer el análisis por HPLC.

Tabla 15.

Resultados de DL₅₀ y DL₁₀₀ de N- fosfometilglicina por HPLC

Compuesto	Método	DL ₅₀	DL ₁₀₀
Glifosato	HPLC-UV	0,74mg.l ⁻¹	0,56mg.l ⁻¹

Fuente: Datos de laboratorio
Elaborado por: El autor

Tabla 16.

DL₅₀ Y DL₁₀₀ de N-fosfometilglicina final

Dosis acumulada	Dosis perdida	Dosis acumulada	Dosis perdida	Dosis Final	Dosis Final
DL ₅₀ (mg.l ⁻¹)	DL ₅₀ (mg.l ⁻¹)	DL ₁₀₀ (mg.l ⁻¹)	DL ₁₀₀ (mg.l ⁻¹)	DL ₅₀ (mg.l ⁻¹)	DL ₁₀₀ (mg.l ⁻¹)
7488	0,74	9792	0,56	7487,26	9291,44

Fuente: Datos de laboratorio
Elaborado por: El autor

En la Tabla 16 se presentó la DL₅₀ y DL₁₀₀ final, la cual se obtiene como resultado que la DL₅₀ tiene un valor de 7487,26mg.l⁻¹ de N-fosfometilglicina en los dos litros de agua, siendo esta la DL₅₀ toxica para los renacuajos, de igual forma la DL₁₀₀ con una concentración de 9291,44mg.l⁻¹ es tóxica letal en la muerte de los renacuajos de la especie *Gastrotheca riobambae*.

Las concentraciones de 0,74 mg.l⁻¹ y 0,56mg.l⁻¹ respectivamente son las concentraciones que se perdido dentro del ensayo, esto debido a la ingestión de los renacuajos y también porque el N- Fosfometilglicina es volátil.

En la actualidad no hay una agencia regulatoria a nivel mundial que exija datos de toxicidad del glifosato en anfibios, pero investigaciones han mostrado la toxicidad que presenta el glifosato a los anuros, tal es caso del estudio que se realizó por primera vez de la toxicidad del glifosato en anfibios australianos en condiciones de laboratorio obteniendo así una DL_{50} 32mg.l^{-1} (UNL, 2010), en Colombia también se realizó un estudio similar obtenido una $DL_{50} = 0,30\text{mg.l}^{-1}$ siendo esta la concentración para la especie más tolerante y $DL_{50} = 144\text{mg.l}^{-1}$ para la especie menos tolerante (Bernal, Solomon, y Carrasquilla, 2003) la dosis DL_{50} encontrada en el ensayo es de $7487,26\text{mg.l}^{-1}$ siendo tóxica en anfibios, la importancia de estos estudios es estipular que el glifosato no es herbicida inofensivo también puede causar daños al ambiente.

6.7 Sensibilidad

Los resultados, indican que los renacuajos expuestos a diferentes concentraciones de N-fosfometilglicina presentan alteración en su comportamiento y muerte.

En la Figura 15 se muestra el cambio de su comportamiento de los renacuajos de la rana *Gastrotheca riobambae* durante el ensayo de toxicidad, donde se evaluó agresividad, falta de movimiento y pigmentación de la piel.

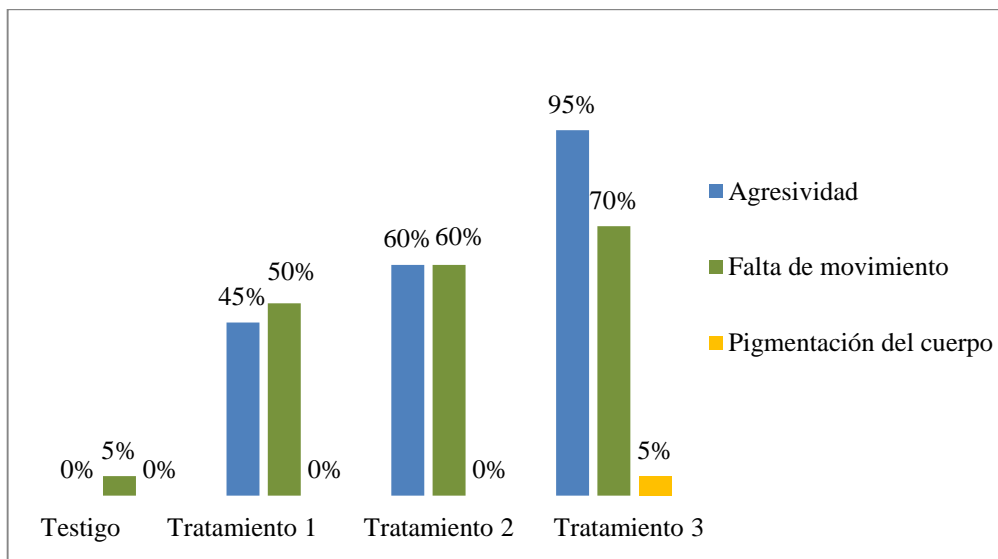


Figura 15. Sensibilidad en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* durante el ensayo de toxicidad con su respectivo tratamiento.

Fuente: El autor

La agresividad es más evidente en mayoría de los tratamientos, por el aumento de la concentración de N-fosfonometilglicina, esto implica que este herbicida influye directamente en alteraciones enzimáticas, hematológicas metabólicas, del desarrollo y reproducción (UNL, 2010) por esta situación individuos realizaban canibalismo, además de presentar estrés por espacio reducido.

La falta de movimiento se presentó en los tratamientos: T1,T2,T3 por ingestión del herbicida si bien la ruta de nade de los renacuajos es mínima, es directamente causa por el N-fosfonometilglicina porque la cantidad de oxígeno también disminuye a medida que el glifosato aumenta y la flotabilidad depende de la cantidad de oxígeno que ingrese a su pulmones (Henao Muñoz et al., 2014) a pesar que el testigo no presentaba dosis de N-fosfonometilglicina los renacuajos realizaban movimientos discontinuos no presentaba agitación o movilidad continua.

La pigmentación de cuerpo no fue notoria en los tratamientos sin excepción alguna. Los cambios de comportamiento que presentaron los renacuajos demuestran que a mayor concentración de N-fosfonometilglicina mayor es su deterioro.

6.8 Mortalidad

En el ensayo se evaluó el límite de tolerancia DL_{50} y DL_{100} en renacuajos de *Gastrotheca riobambae* a las 8 semanas sometidas a diferentes concentraciones.

Tabla 17.

Muerte registrada de los renacuajos durante las 8 semanas en función de N-fosfometilglicina.

Repeticiones	Tratamientos											
	T1			T2			T3			Testigo		
	Dosis baja			Dosis media			Dosis alta					
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Semana6	0	0	0	1	0	0	5	4	4	0	0	0
Semana7	1	0	1	2	2	1	0	0	1	0	0	0
Semana8	3	3	3	3	4	3	3	4	3	0	0	0

Fuente: Datos de laboratorio

Elaborado por: El autor

En la Tabla 17 se muestra la mortalidad de renacuajos por tratamientos y repeticiones, cada repetición contaba con 8 renacuajos, si bien el ensayo se desarrolló en un lapso de 8 semanas, la muerte de los renacuajos se presenta a la sexta semana en el tratamiento 3 (dosis alta) con el deceso del 50% de individuos, el tratamiento 1 (dosis baja) presenta mortalidad de sus ejemplares a la séptima semana, a la octava semana el 50 % de los individuos mueren, el tratamiento 2 (dosis media) a la octava semana más del 50 % de individuos mueren, en el caso del tratamiento 3 en la octava semana los individuos mueren en su totalidad.

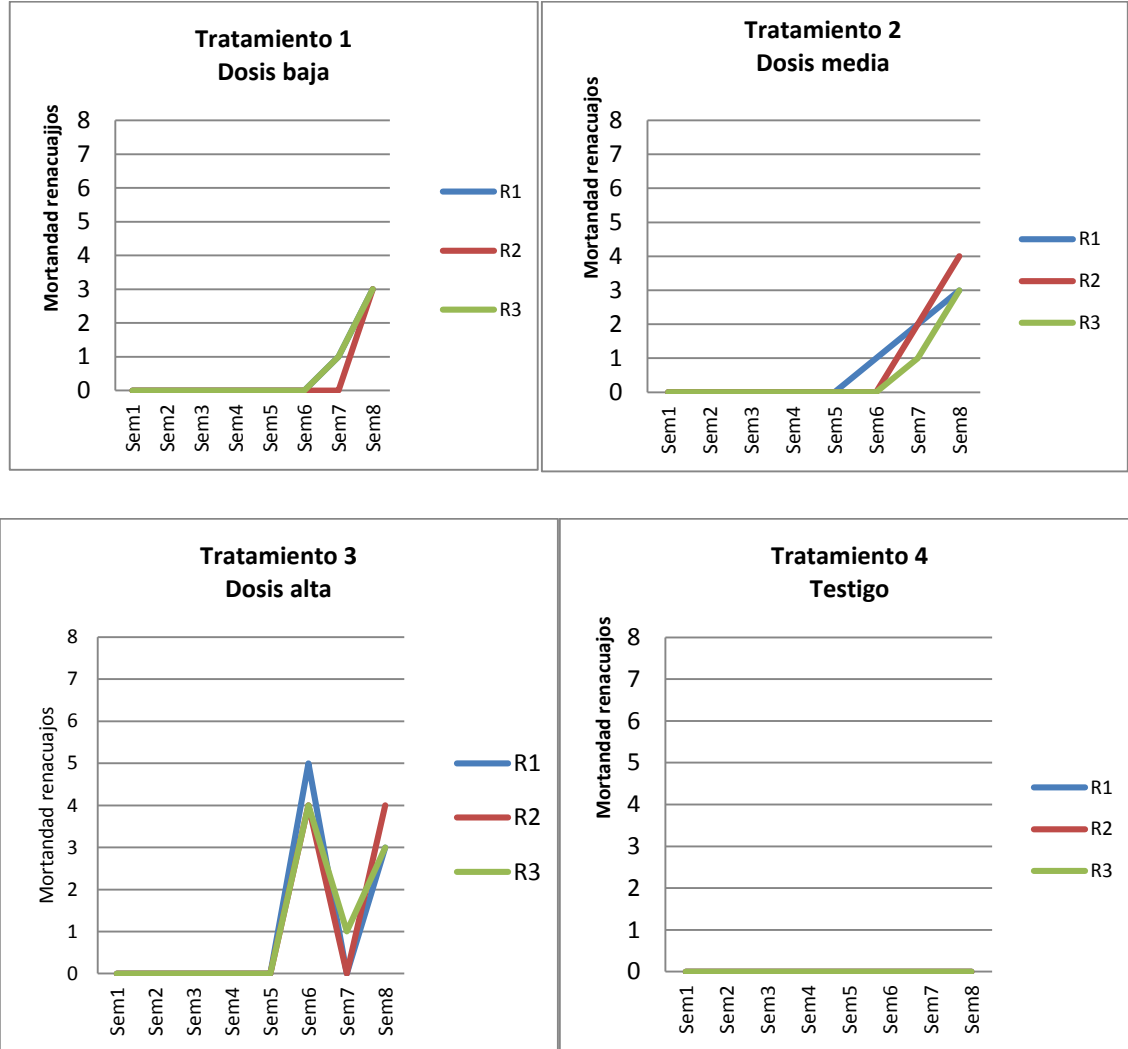


Figura 16. Mortandad en las 8 semanas de ensayo con N-fosfonometilglicina
Fuente: Datos de laboratorio
Elaborado por: El autor

6.9 Análisis estadístico a la octava semana

Para el análisis de varianza (ADEVA), se procedió a realizar la prueba de normalidad Shapiro Wilk y la prueba de homogeneidad de Levene, con el programa R project, la cual se obtuvo el valor $P = 0,37$ para prueba de normalidad y $P = 0,95$ para la prueba de homogeneidad, estos valores son más altos que el valor $P = 0,05$. Concluyendo así que los datos obtenidos en el ensayo se encuentran en distribución normal, siendo aplicables para el análisis (ADEVA).

El análisis de varianza Tabla 18, se puede observar que hay una diferencia significativa entre los tratamientos aplicados bajo exposición de glifosato a renacuajos durante 8 semanas.

Tabla 18.

Análisis de varianza mortalidad de renacuajos

FV	GL	SC	CM	Fo	F0,05
Total	11	104,3	9,48		
Tratamientos	3	100,9	33,64	80,73	*
Error experimental	8	3,33	0,41		

Fuente: Software GraphPad, 2017

Elaborado por: El autor

En la prueba Tukey al 5% se definió que existen diferencias significativas, entre los tratamientos y el testigo, afirmando que el N- fosfometilglicina a mayor concentración influye directamente en la muerte de los renacuajos de la *Gastrotheca riobambae*, por esta razón el Tratamiento 3 causa la mortalidad total de los renacuajos.

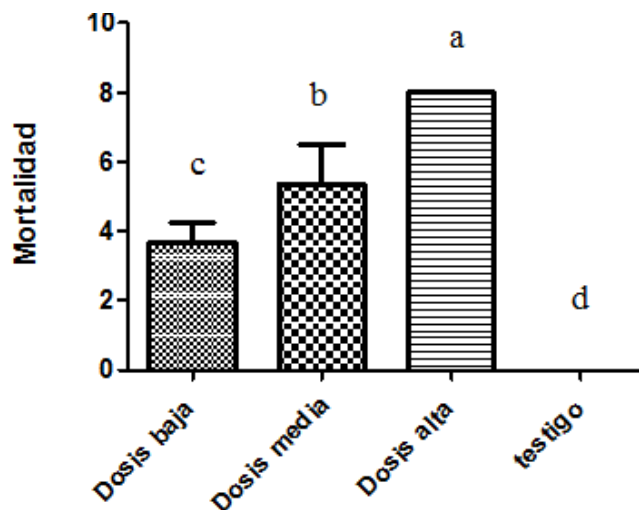


Figura 17. Promedio mortalidad por tratamientos de N-fosfometilglicina
Elaborado por: El autor

6.10 Socialización

En las instalaciones de la PUCE-SI con la asistencia de 25 personas entre docentes y estudiantes de la carrera de Ciencias Ambientales, se realizó la socialización de la investigación con el propósito de valorar la aceptación de la misma como se muestra en la Figura 18.

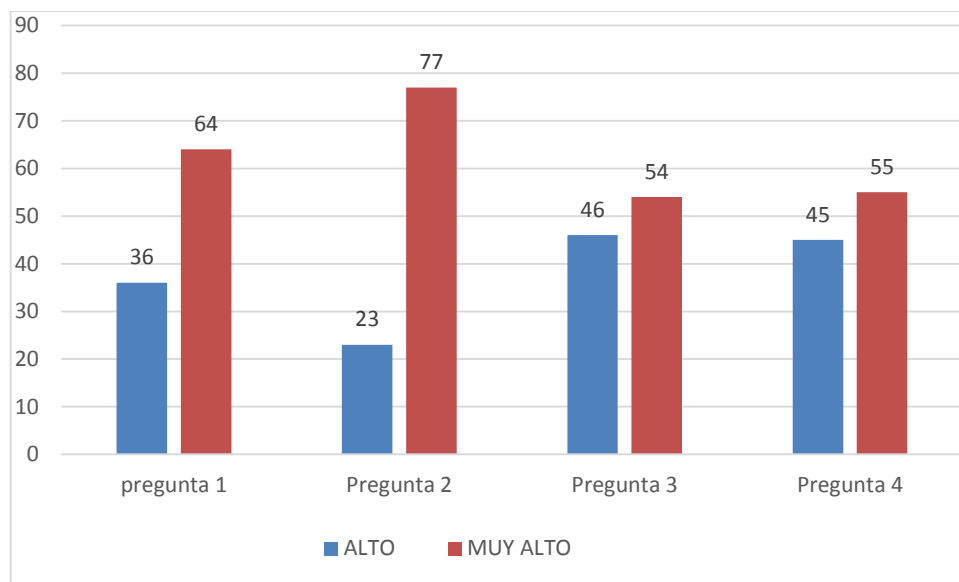


Figura 18. Resultados de la socialización de la investigación
Fuente: Encuestas sobre la investigación Anexo 14

Se determina que la investigación tuvo relevancia para algún sector de la sociedad con un 64% y 36% en escala de muy alto y alto, respectivamente (pregunta 1). El 77% y 23% indicaron que el estudio posee perspectivas para estudios complementarios posteriores (pregunta 2); el 54% y 46% consideraron que la temática genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización (pregunta 3); y por último lugar el 55 %y 45% valoraron que los objetivos planteados se cumplieron en la investigación (pregunta 4). Este interés demuestra la importancia de evaluar el principio activo de herbicidas que afectan al medio ambiente (Figura 18).



Figura 19. Socialización de la investigación en la PUCESI
Fuente: El autor

7. CONCLUSIONES

Por medio de georreferenciación se identificó áreas específicas de cultivos agrícolas de la parroquia La Esperanza que están aledañas a las quebradas Seca, San Clemente y Rumipamba, las cuales pueden ser afectadas por la aspersion de N-fosfometilglicina a través de la infiltración y escorrentía, pudiendo así dañar la vida acuática de estos cuerpos de agua.

Las concentraciones determinadas por HPLC en suelo reflejó que sobrepasan el Límite Máximo Permisible de pesticidas ($0,1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de acuerdo a la norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados del Libro VI (Anexo 2) del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente del Ecuador.

Los renacuajos durante el experimento mostraron alteración etológica como agresividad, canibalismo, letargia, la cual se fue agravando conforme la concentración de N-fosfometilglicina aumentaba, en este sentido, la DL_{50} se produjo a la sexta semana con una concentración de $7487,26\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, y a la octava semana se obtuvo la DL_{100} con una concentración $9791,44\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

La socialización de la investigación evidenció gran interés y aceptación del público; determinando que la investigación tuvo relevancia para algún sector de la sociedad con un 64% y 36% en escala de muy alto y alto, respectivamente. El 77% y 23% indicaron que el estudio posee perspectivas para estudios complementarios posteriores; el 54% y 46% consideraron que la temática genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización; y por último 55% y 45% valoraron que los objetivos planteados se cumplieron en la investigación.

8. RECOMENDACIONES

Generar concientización a la población de la parroquia La Esperanza mediante capacitaciones de educación ambiental y el manejo adecuado de herbicidas en los cultivos agrícolas, para disminuir las concentraciones de N-fosfonometilglicina en el suelo y su lixiviación en las quebradas: Seca, San Clemente y Rumipamba.

Realizar seguimiento en cuerpos de agua sobre el contenido de N-fosfonometilglicina que permita la evaluación de las concentraciones y futura toma de decisiones en comparación con la DL₅₀ y DL₁₀₀ determinada en esta investigación sobre el principio activo del herbicida en esta investigación, para la preservación de especies en peligro.

Evaluar la toxicidad de N-fosfonometilglicina en otras etapas del ciclo biológico de la *Gastrotheca riobambae*, así como la afección interna causadas por la absorción del herbicida.

Realizar estudios de toxicidad del N-fosfonometilglicina en otras especies de anuros, ya que esta Orden taxonómico desarrolla su vida en medios acuáticos y terrestres, haciéndolos más susceptibles.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. y Eischeid, J. (2001). Climate variability in regions of amphibian declines. *Conservation Biology*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015004930.x>
- Arboleda, J., Solano, J., Romero, M. y Gómez, E. (2000). Informe nacional sobre el uso y manejo de plaguicidas en Colombia, tendiente a identificar y proponer alternativas para reducir el escurrimiento de plaguicidas al Mar Caribe. *Ministerio de Medio Ambiente, Proyecto PNUMA-UCR/CAR*.
- Avila, H. (2006). Introduccion a la metologia de investigacion. *Eumed*, 100–195. Retrieved from <https://clea.edu.mx/biblioteca/>
- Baird, R., Batson, W., Watson, C. y Hightower, P. (2004). Evaluation of transgenic cotton varieties and a glyphosate application on seedling disease incidence. *Mycopathologia*. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-2303-9>
- Bernal, M., Solomon, K. y Carrasquilla, G. (2003). Toxicidad del glifosato formulado (Glyphos®) y Cosmo-Flux® para ranas colombianas en estadio larvario 1. Toxicidad aguda de laboratorio. In *La producción de drogas ilícitas, el medioambiente y la salud humana*.
- Bozzo, A. (2010). Persistencia Del Glifosato Y Efecto De Sucesivas Aplicaciones En El Cultivo De Soja En Agricultura Continua En Siembra Directa Sobre Parametros Biologicos Del Suelo. *Facultad De Ciencias - Maestria En Ciencias Ambientales*. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00614-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00614-1)
- Bustos, M. (2012). Destino ambiental del glifosato en una zona arrocera del Tolima, Colombia. *Facultad de Agronomia*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2001.0725>
- Camiñas, J. (2002). Estatus y conservación de las Tortugas Marinas en España. In *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*.
- Carvalho, F., Nhan, D., Zhong, C., Tavares, T., y Klaine, S. (1998). Results of an international research project: Tracking pesticides in the tropics. *IAEA Bulletin*.
- Castillo, M. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, 100.
- Coloma, L., Frenkel, C. (2012). AmphibiaWebEcuador - Sinopsis de la especie.
- Coloma, L. (2008). *gastrotheca riombambae*. Retrieved November 18, 2017, from https://bioweb.bio/galeria/Foto/Gastrotheca_riobambae/Ontogenia/238846

- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>
- De la Peña de Torres, E., y Herrero, O. (2005). Evaluación toxicológica de residuos orgánicos. *Revista de Salud Ambiental*.
- Duellman, W. (1987). Marsupial Frogs (Anura: Hylidae: Gastrotheca) of the Ecuadorian Andes: Resolution of Taxonomic Problems and Phylogenetic Relationships. *Herpetologica*.
- Duellman, W. y Maness, S. (1980). The Reproductive Behavior of Some Hylid Marsupial Frogs. *Journal of Herpetology*. <https://doi.org/10.2307/1563542>
- Edginton, A., Sheridan, P., Stephenson, G., Thompson, D., y Boermans, H. (2004). Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. In *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1897/03-115>
- Environment, C. C. of M. of the. (1999). Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health - Cadmium (1999). Canadian Environmental Quality Guidelines. <https://doi.org/10.2753/PSS0885-3134280205>
- Gill, J., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., y Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>
- Haney, R., Franzluebbers, A., Porter, E., Hons, F., y Zuberer, D. (2004). DIVISION S-3—SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY Soil Carbon and Nitrogen Mineralization: Influence of Drying Temperature. *Soil Science Society of America Journal*.
- Henao, L., Triana, T., y Bernal, M. (2014). Evaluación de la toxicidad de dos agroquímicos, roundup® activo y cosmo-flux®411f, en renacuajos de anuros colombianos. *Acta Biológica Colombiana*. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.43492>
- Kawulich, B. (2005). La observación participante como método de recolección de datos. *Educación*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Merino V, Coloma, A. (2005). Estudios sobre las Ranas Andinas de los Géneros Telmatobius y Batrachophrynus (Anura : Leptodactylidae). *Monogr. Herpetol.* <https://doi.org/150/3/223-a> [pii]
- Michaels, J., Downie, R., y Campbell-Palmer, R. (2014). The importance of enrichment for advancing amphibian welfare and conservation goals: A review of a neglected topic. *Amphib. Reptile Conserv Amphibian & Reptile Conservation [General Section]*.

- Ministerio de Justicia y del Derecho. (2000). Identificación del herbicida glifosato propiedades y toxicidad. *Documento de Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos*.
- Moya, M., Alarcón, I., y del Pino, M. (2007). Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.036>
- Nivia, E. (2015). Efectos Sobre la Salud y el Ambiente de Herbicidas que Contienen Glifosato.
- Ostera, M., Malanga, G., y Puntarulo, S. (2016). Actualización Sobre Aspectos Oxidativos Del Efecto Del Glifosato En Sistemas Biológicos. *Biotecnia*.
- Pacheco, P. (2015). “Evaluación del ciclo reproductivo de la rana marsupial andina (*gastrotheca riobambae*) en jaulas exteriores en el centro experimental académico salache, universidad técnica de cotopaxi.” Universidad Técnica de Cotopaxi. Retrieved from <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2834/1/T-UTC-00358.pdf>
- Peña, C. (2005). Tipos de toxicidad y escalas de valoración. *Oncología*, 28, 6. Retrieved from <http://scielo.isciii.es/pdf/onco/v28n2/04.pdf>
- Ramirez, S. Y Rodriguez, M. (2011). Estado poblacional y relaciones ecológicas de *Gastrotheca riobambae* (Anura: Hemiphractidae) en dos localidades del Volcán Pasochoa, Pichincha – Ecuador (PDF) . Universidad Central del Ecuador. Retrieved from www.researchgate.net/publication/311912745_Estado_poblacional_y_relaciones_ecologicas_de_Gastrotheca_riobambae_Anura_Hemiphractidae_en_dos_localidades_del_Volcan_Pasochoa_Pichincha_-_Ecuador
- Relyea, A. (2005). The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*. <https://doi.org/10.1890/04-1291>
- Rocio, C. (2006). Utilización de bioensayo para la determinación de contaminación en agua de riego en la cuenca del río granobles. *La Granja*, 4, 38–42. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047388005.pdf>
- Rodríguez, H., Guerrero, J. y Castro, R. (2002). Determinación de residuos de glifosato y de su metabolito ácido aminometilfosfónico en aguas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con derivación poscolumna y detección por fluorescencia. *Revista Colombiana de Química*, 31, 7–18. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/17151>
- Steiner, J., Seitz, A., Wiczorek, K., Plotner, K., Isikveren, T., y Hornung, M. (2012). Multi-disciplinary design and feasibility study of distributed propulsion systems. *28th Congress of the International Council of the Aeronautical Sciences 2012, ICAS 2012*.

- Triana, T., Rojas, M. y Bautista, H. (2013). Efectos letales y subletales del glifosato (roundup® activo) en embriones de anuros colombianos. *Acta Biológica Colombiana*.
- UNL. (2010). Informe del grado de toxicidad del glifosato UNL. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Villota, E., y Duellman, E. (2012). Distribution, habitat, and abundance of a Marsupial frog, *Gastrotheca ruizi* (Anura: Hemiphraactidae), in southern Colombia. *Herpetology Notes*, 5(May), 193–196. <https://doi.org/10.1159/000322111>
- Williams, M., Kroes, R., y Munro, C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1371>

ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas

CCME	Guías de calidad ambiental de Canadá
ECAA	Escuela de ciencias Agrícolas y ambientales
EPA	Agencia de protección ambiental
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
PUCESI	Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra
SIIT	Sistema Integrado de Información Taxonómica
WHO	Organización mundial de la salud
MAE	Ministerio del Ambiente Ecuador
UICN	La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

Anexo 2. Medias de longitud cabeza - cola (tamaño)

Tamaño inicial del ensayo	
Muestra (renacuajos)	\bar{X} Tamaño
1	18,13mm
2	17,90mm
3	18,11mm
4	18,00mm
5	18,13mm
6	18,15mm
7	17,96mm
8	18,68mm
\bar{X}	18,13mm
Tamaño final del ensayo	
Muestra (renacuajos)	\bar{X} Tamaño
1	20,11mm
2	19,68mm
3	20,15mm
4	19,30mm
5	20,20mm
6	19,86mm
7	20,22mm
8	20,14mm
\bar{X}	19,96mm

Fuente: El autor

Anexo 3. Variables de control

Parámetros evaluados en el ensayo segunda fase

Aclimatación															
Parámetros															
Miércoles 19-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (us/ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1	19,8	19,8	19,9	8,06	8,05	8,06	531	536	529	7,3	84	7,5	85	7,7	86
T2	19,8	19,9	19,9	8,06	8,06	8,06	531	536	531	7,3	83	7,3	84	7,2	83
T3	19,8	19,8	19,9	8,06	8,06	8,07	532	533	531	7,2	83	7,2	84	7,2	84
T4	19,8	19,8	19,7	8,04	8,05	8,05	531	531	535	8,4	89	8,1	88	8,0	88
Jueves 20-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (us/ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1	19,9	19,8	19,9	8,06	8,04	8,05	530	533	530	7,1	83	7,3	85	7,5	86
T2	19,8	19,7	19,9	8,06	8,06	8,04	531	536	532	7,2	83	7,3	84	7,1	83
T3	19,9	19,8	19,9	8,05	8,03	8,07	535	533	531	7,2	84	7,2	84	7,1	83
T4	19,7	19,9	19,8	8,03	8,04	8,04	530	533	535	8,3	89	8,0	88	8,0	88
Viernes 21-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (us/ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1	20,1	19,9	19,9	8,05	8,05	8,01	536	536	533	7,1	83	7,4	85	7,4	85
T2	19,9	19,9	20,1	8,03	8,06	8,04	534	534	535	7,2	84	7,3	84	7,2	80
T3	20,1	19,8	19,9	8,04	8,06	8,05	534	530	531	7,1	80	7,0	83	7,0	83
T4	19,9	20,0	19,8	8,03	8,04	8,03	536	530	535	7,9	87	8,0	88	8,0	88
Sábado 22-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (us/ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1	20,0	19,8	19,9	8,03	8,05	8,04	530	536	529	7,0	83	7,4	86	7,5	86

T2	19,8	20,0	19,8	8,05	8,07	8,06	533	536	531	7,1	83	7,0	83	7,1	83
T3	19,8	19,8	20,1	8,05	8,06	8,03	532	533	530	7,1	83	7,1	83	7,0	83
T4	19,9	19,8	19,8	8,03	8,05	8,05	531	532	535	8,4	90	8,1	88	8,0	88
Ensayo 26-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (us/ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1 2448 (mg/l)	21,7	21,7	21,7	7,73	7,73	7,72	722	709	711	8,4	90	8,3	90	8,2	88
T2 4896 (mg/l)	21,7	21,7	21,7	7,64	7,63	7,67	876	879	892	8,1	88	8,3	90	8,3	90
T3 9792 (mg/l)	21,7	21,7	21,7	7,54	7,52	7,53	1196	1168	1194	8,5	90	8,4	90	8,4	90
Test	21,5	21,7	21,5	7,93	7,93	7,90	550	550	551	8,8	90	8,6	90	8,6	90
Ensayo															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (us/ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1 2448 (mg/l)	20,1	20,1	20	7,52	7,53	7,60	731	721	720	6,7	80	6,3	79	6,5	69
T2 4896 (mg/l)	20	20	20,1	7,51	7,53	7,52	879	881	893	6,6	79	6,7	80	6,5	80
T3 9792 (mg/l)	20,1	20,	20	7,40	7,41	7,40	1156	1165	1199	6,6	81	6,7	82	6,6	80
Test	20,1	20	20	7,55	7,58	7,58	584	581	581	6,6	79	6,6	79	6,6	80
Ensayo															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1 2448 (mg/l)	19,1	19,1	19,1	7,01	7,02	7,03	1180	1190	1204	6,1	71	6,1	70	6,1	70
T2 4896 (mg/l)	19,1	19,1	19,1	6,52	6,57	6,59	1856	1776	1841	6,1	69	6,1	71	6,1	68
T3 9792 (mg/l)	19,1	19,1	19,1	6,47	6,36	6,30	2054	2062	2050	6,1	70	6,1	72	6,1	69
Test	19,1	19,1	19,1	7,86	7,82	7,85	584	586	586	6,2	70	6,3	72	6,2	72
Ensayo															

Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1 2448 (mg/l)	19,2	19,1	19,2	7,03	7,01	6,94	1177	1590	1616	4,5	52	4,5	52	4,5	51
T2 4896 (mg/l)	19,2	19,2	19,2	6,28	6,28	6,27	2080	2067	2077	4,7	54	4,6	53	4,6	53
T3 9792 (mg/l)	19,1	19,2	19,1	6,05	6,03	6,00	4,67	4,67	6,68	4,5	52	4,5	53	4,5	50
Test	19,1	19,1	19,1	7,15	7,17	7,19	617	607	609	4,5	52	4,5	51	4,5	52
Ensayo 26-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1 2448 (mg/l)	19,3	19,1	19,3	6,89	6,94	6,87	2008	2007	2007	4,4	52	4,2	49	4,3	51
T2 4896 (mg/l)	19,3	19,2	19,3	6,18	6,18	6,19	4,68	4,77	4,85	4,3	50	4,3	50	4,3	51
T3 9792 (mg/l)	19,3	19,1	19,1	6,02	6,00	5,98	6,95	6,88	5,96	4,3	51	4,3	50	4,2	49
Test	19,3	19,3	19,3	7,14	7,13	7,14	617	610	609	4,5	52	4,4	52	4,4	52
Ensayo 26-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1 2448 (mg/l)	19	19,1	19,1	6,14	6,17	6,12	3,74	3,58	3,82	3,9	45	3,9	44	3,9	45
T2 4896 (mg/l)	19,1	19,1	19	6,05	6,08	6,02	6,25	5,97	6,30	3,9	44	3,9	45	3,9	45
T3 9792 (mg/l)	19,1	19,1	19,1	5,98	5,97	5,96	8,95	8,50	8,77	3,9	42	3,9	42	3,9	44
Test	19,1	19,1	19	7,01	7,10	7,12	611	610	611	4,1	48	4,1	45	4,1	49
Ensayo 26-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	

T1 2448 (mg/l)	19,6	19,6	19,6	6,13	6,15	6,10	4,85	4,55	4,63	3,6	41	3,5	41	3,5	41
T2 4896 (mg/l)	19,6	19,6	19,6	5,95	5,68	5,95	7,96	6,06	7,95	3,6	41	3,6	40	3,7	43
T3 9792 (mg/l)	19,6	19,6	19,6	5,82	5,81	5,78	10,59	9,91	10,26	3,7	43	3,8	43	3,7	43
Test	19,6	19,6	19,6	6,82	7,64	7,22	754	764	734	3,7	43	3,6	41	3,6	40

Ensayo 26-04-2017															
Trata.	Temperatura			pH			Conductividad Eléctrica (ms)			Oxígeno Disuelto					
										mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
		II	III	I	II	III	I	II	III	I		II		III	
T1 2448 (mg/l)	18,1	18	18,1	5,97	6,02	5,96	6,36	5,79	6,44	3,7	42	3,7	43	3,7	43
T2 4896 (mg/l)	18,1	18,1	18,1	5,80	5,82	5,83	9,91	8,96	9,78	3,6	42	3,6	41	3,6	41
T3 9792 (mg/l)	18,1	18,1	18,1	5,69	5,69	5,67	17,00	15,00	15,75	3,6	40	3,6	42	3,6	42
Test	18,1	18,1	18,1	6,59	7,03	7,24	987	992	942	3,7	43	3,7	43	3,7	43

Fuente: El autor

Anexo 4. Mortalidad registrada de la *Gastrotheca riobambae* durante el ensayo

Ensayo moralidad													
		Tratamientos											
		T1			T2			T3			T4		
Repeticiones		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Semanas	Semana1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Semana2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Semana3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Semana4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Semana5	0	0	0	0	0	0	5	4	4	0	0	0
	Semana6	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	Semana7	1	0	1	2	2	1	3	4	3	0	0	0
	Semana8	3	3	2	3	4	3	1	0	1	0	0	0
Total vivos		4	5	5	2	2	4	0	0	0	8	8	8
Total muertos		4	3	3	6	6	4	8	8	8	0	0	0

Fuente: El autor

Anexo 5. Recolección muestras de suelo



Fuente: El autor

Anexo 6. Resultados de muestras de suelo



Plantsphere Laboratories

ANÁLISIS DE LABORATORIO PSL-711
residualidad y biofísica de suelos.

Contacto: Sr. José Acero	Instituto Remitente:
Tel.:	Universidad Católica de Ibarra
Localización:	Provincia: Ibarra
Email:	Orden de trabajo: 711
Tipo de muestra: suelo	Cultivo: maíz, cebada, trigo
Edad Productiva: no reportado	Fenofisiología: no reportado
Fecha Ingreso: 13.07.2017	Fecha de Lab: 08.07.2017

RESULTADOS DE LABORATORIO

ITEM	MUESTRAS			METODO
	VALORES			
	M1	M2	M3	
Humedad	22 %	20%	18%	Gravimétrico
Textura	30 % arena, 19 % limo, 51 % arcilla.	28 % arena, 21 % limo, 51 % arcilla.	24 % arena, 26 % limo, 50 % arcilla.	Textural – Bouyoucus.
d	1.19	1.09	0.95	Psl 202
Materia Orgánica	2.2 %	2.7%	1.9%	Walkley-Black
pH	7.01	6.42	5.95	Potenciómetro
ce	0.16 mS cm ⁻¹	0.06 mS cm ⁻¹	0.11 mS cm ⁻¹	Conductímetro de sonda

M1: P1 Cultivo de cebada y trigo. **M2:** P2 cultivo de maíz. **M3:** renovación de suelos para la siembra

ANÁLISIS DE RESIDUALIDAD

Producto rastreado: Glifosato (Sal isopropilamina de N-(Fosfona metil) glycina)

MOLECULA	CONCENTRACION SUELO		
	M1	M2	M3
isopropilamina de N-(Fosfona metil) glycina	0.4 mg Kg ⁻¹	0.0mg Kg ⁻¹	0.01mg Kg ⁻¹

Anexo 7. Protocolo determinación de N-fosfometilglicina



PROTOCOLO No. 114. Procesamiento de muestras de suelo en laboratorio para la determinación de GLIFOSATO Sal isopropilamina de N-(Fosfometil) glicina.

El procedimiento es un registro de ajuste y adaptación de muestras de suelo, para la determinación de Sal isopropilamina de N-(Fosfometil) glicina

MATERIALES Y METODOS

1. 4-aminoantipirina, Sigma Aldrich
2. 1,2-naftoquinona-4-sulfonato, Sigma Aldrich.
3. Ácido acético, J.T Baker.
4. Ácido aminometilfosfónico, Sigma Aldrich.
5. Acido clorhídrico, J.T Baker.
6. Agua desionizada y purificada (18 MΩ, Milli-Q)
7. Ampicilina, Sigma Aldrich
8. Cloruro de calcio, sigma Aldrich
9. Fosfato de sodio monobásico, J.T Baker.
10. Glifosato, Sigma Aldrich.
11. Hipoclorito de sodio, Solución 10%, J.T Baker.
12. Metanol, J.T Baker.
13. Molibdato de sodio, Sigma Aldrich.
14. Ninhidrina, J.T Baker.
15. Tetraborato de sodio, Sigma Aldrich.
16. Agitador mecánico.
17. Balanza analítica
18. Baño ultrasónico.
19. Centrifuga.
20. Columna analítica de sílice C₁₈ (Zorbax eclipse plus C18, Agilent Technologies) 150 x 4.6 mm, 5 μm de diámetro de partícula
21. Cromatógrafo de líquidos con bomba cuaternaria, Perkin Elmer, Series 200
22. Detector de fluorescencia Perkin Elmer modelo LC 240
23. Detector de UV-Vis Perkin Elmer modelo Series 200
24. Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 40 utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico
25. Micropipetas, Eppendorf de volumen variable 100-1000 μl
26. Potenciómetro CORNING modelo 450
27. Purificador y desionizador de agua Milli-Q

PROCEDIMIENTO

1. Procesar las muestras de suelo MS, biofísicamente (protocolo PSL-113). En tubos de propileno de 15 ml, se procede a mezclar 0,1 g de suelo mas 4 ml de tetraborato de sodio 0.05 mol l^{-1} , agitándolas 60 min, para luego centrifugar a 4000 rpm por 15 min. Posteriormente el sobrenadante se procede a derivar.
2. A las muestras anteriores se comparan muestras de verificación (MV) que conjugados de diferente tipo de suelo con concentraciones del mismo tipo de suelo, con los cuales, se incuban con concentraciones conocidas de la sal isopropilamina de N fosfo metil glicina.
3. De las MS procesadas se toman 300 ul de la solución sobrenadante y se incuban con 228 ul de NQS (0.03 mol l^{-1} en HCl 0.1 mol l^{-1}). 60 μl de estándar interno de 4-aminoantipirina (100 mg l^{-1}), aforado a 1 ml con una solución de tetraborato de sodio 0.05 mol l^{-1} . Con ajuste de pH a 9.4. Esta mezcla se tiene que incubar en un baño termostatado (60°C) por 5 min. Una vez frío, se adicionan 60 μl de HCl 0.25 mol l^{-1} , para direccionar compuestos neutros. La solución se filtra con acetato de celulosa $0.45 \mu\text{m}$ y finalmente se inyecta en un sistema cromatográfico.

PROCEDIMIENTO DE CROMATOGRAFIA

1. Las MS se analizan con cromatografía de líquidos CL (PerkinElmer MA, USA), UV-Vis a 217 nm. Conectado a un inyector manual con un loop externo de 20 μl , con una columna C-18 como fase estacionaria. La fase móvil es 1% de ácido acético-metanol (60:40 v/v) a un flujo de 1.0 ml min^{-1} , a temperatura de $23\text{-}25^{\circ}\text{C}$.

Fuente: El autor

Anexo 8. Dosis letal



Fuente: El autor

Anexo 9. Resultados DL50 y DL100



INFORME DE ENSAYO NR. 168643

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente como: AGUA DL50
CODIGO LABORATORIO: 168643-1
TIPO DE PRODUCTO: AGUA DL50
CLIENTE: ACERO ANGEL
DIRECCION: IBARRA - SAN ROQUE
CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: ENVASE PLÁSTICO CON TAPA
NUMERO DE LOTE: ND
FECHA RECEPCION: 18/10/15
FECHA INICIO ENSAYO: 18/10/15
CONTENIDO DECLARADO: ND
CONTENIDO ENCONTRADO: 250 ml
FECHA DE ELABORACION: ND
FECHA DE CADUCIDAD: ND
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: Temperatura 21 ° C
FORMA DE CONSERVACIÓN: AMBIENTE
MUESTREO: ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS FISICO QUIMICOS [§]	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Glifosato	HPLC-UV	%	0,74

NS: No solicita el cliente/ ND: No declara.

[§] Resultado proporcionado por Laboratorio SUBCONTRATADO, cuya competencia para la ejecución de este ensayo fue evaluada mediante el procedimiento SEOP 4.5 de SEIDLABORATORY.

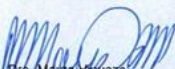
Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representatividad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomado.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico

• Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,


Dra. María Viterzo
Director de Calidad
Director Técnico (E)

18/10/15
FECHA EMISION

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio

Muestras perecibles: 8 días calendario; Muestras no perecibles: 30 días calendario. Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el periodo estipulado.

Nota: Para consultas, quejas o sugerencias, favor comunicarse a los siguientes correos:

Dirección de Calidad directordecalidad@seidlaboratory.com.ec; Gerencia General gerenciageneral@seidlaboratory.com.ec;
Servicio al Cliente servicioalcliente@seidlaboratory.com.ec ó a los teléfonos 022476314-022483145-0995450911-0992750633.

Melchor Toaza N61-63 entre Av. del Maestro y Nazareth
www.seidlaboratory.com.ec

Fuente: El autor

Anexo 10. Resultados DL₅₀ y DL₁₀₀



INFORME DE ENSAYO NR. 168644

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente como: AGUA DL100
CODIGO LABORATORIO: 168644-1
TIPO DE PRODUCTO: AGUA DL100
CLIENTE: ACERO ANGEL
DIRECCION: IBARRA - SAN ROQUE
CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: ENVASE PLÁSTICO CON TAPA
NUMERO DE LOTE: ND
FECHA RECEPCION: 18/10/15
FECHA INICIO ENSAYO: 18/10/15
CONTENIDO DECLARADO: ND
CONTENIDO ENCONTRADO: 250 ml
FECHA DE ELABORACION: ND
FECHA DE CADUCIDAD: ND
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: Temperatura 21 ° C
FORMA DE CONSERVACIÓN: AMBIENTE
MUESTREO: ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS FISICO QUIMICOS ^a	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Glifosato	HPLC-UV	%	0,56

NS: No solicita el cliente/ ND: No declara.

^a Resultado proporcionado por Laboratorio SUBCONTRATADO, cuya competencia para la ejecución de este ensayo fue evaluada mediante el procedimiento SEOP 4,5 de SEIDLABORATORY.

Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.


El laboratorio no se responsabiliza por la representabilidad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomado.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico

• **Tiempo de almacenamiento de informes:** Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,

18/10/31
FECHA EMISION


 Dra. Mayra Viqueza
 Director de Calidad
 Director Técnico (E)

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio

Muestras perecibles: 8 días calendario; Muestras no perecibles: 30 días calendario. Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el periodo estipulado.

Nota: Para consultas, quejas o sugerencias, favor comunicarse a los siguientes correos:
 Dirección de Calidad directordecalidad@seidlaboratory.com.ec; Gerencia General gerenciageneral@seidlaboratory.com.ec;
 Servicio al Cliente servicioalcliente@seidlaboratory.com.ec ó a los teléfonos 022476314-022483145-0995450911-0992750633.

Melchor Toaza N61-63 entre Av. del Maestro y Nazareth
www.seidlaboratory.com.ec

Fuente: El autor

Anexo 11. Invitación a la Socialización



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial Invitación a la socialización del trabajo de investigación:
CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA EN RENACUAJOS DE LA RANA (*Gastrotheca riobambae*) EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE N- FOSFONOMETILGLICINA.

Cuyo autor es: Angel Acero, de la carrera de: Ciencias Ambientales Y Ecodesarrollo

Fecha: 07 de Diciembre del 2018

Lugar: Edificio cuatro de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

Hora: 4:00 pm

RESUMEN
El N-fosfonometilglicina es un herbicida que ha tenido un gran impacto sobre el ambiente lo que ha provocado problemas de toxicidad en sistemas acuáticos, además contaminación del suelo por el uso excesivo (Relyea, 2005). Por tal razón esta investigación tiene como fin obtener la dosis letal, DL₅₀ y DL₁₀₀ en renacuajos de la *Gastrotheca riobambae*. La investigación contribuye a mejorar las prácticas agrícolas y el uso adecuado del herbicida, para prevenir la extinción de especies vulnerables como son las ranas.


Fuente: El autor

Anexo 12. Socialización




Fuente: El autor

Anexo 13. Lista de asistencia

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD			
LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN			
NOMBRE DEL EXPOSITOR: <i>Angel Acejo</i> CARRERA: <i>Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo</i> FECHA: <i>07-11-2018</i>			
NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCIÓN A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Luis Navarce	1757560188	PUCE-SI	<i>Luis Navarce</i>
Paola Haro	100415805-9	PUCE-SI	<i>Paola Haro</i>
Esther Chabín	10046799418	PUCE-SI	<i>Esther Chabín</i>
Mayra Pinode	1003818323	PUCE-SI	<i>Mayra Pinode</i>
GISELLO SANTANDER	100411409-4	PUCE-SI	<i>Gisello Santander</i>
ROBERTO PORTIÑO	100402101-8	PUCE-SI	<i>Roberto Portiño</i>
Melany Pitawar	1004616817	PUCE-SI	<i>Melany Pitawar</i>
Jacqueline Valencia	080406867-4	PUCE-SI	<i>Jacqueline Valencia</i>
Oscar Méndez	100433896-6	PUCE-SI	<i>Oscar Méndez</i>
Damian Nejer	172080801-1	PUCE-SI	<i>Damian Nejer</i>
Gabriela Veloz	10049806-3	PUCE-SI	<i>Gabriela Veloz</i>
Domenice Polomayo	060401861-4	PUCE-SI	<i>Domenice Polomayo</i>
Domenica Gutiérrez	040119666-9	PUCE-SI	<i>Domenica Gutiérrez</i>
Gardenia Hoije O.	040189255-9	PUCE-SI	<i>Gardenia Hoije O.</i>
Alexis Amijos	110343300-5	PUCE-SI	<i>Alexis Amijos</i>
Jessica Rodríguez	100467896-5	PUCE-SI	<i>Jessica Rodríguez</i>
Michelle Montenegro	1722169180	PUCE-SI	<i>Michelle Montenegro</i>
Ivís Rodríguez	040188898-7	PUCE-SI	<i>Ivís Rodríguez</i>
Jaidy Gamba Salas	0802633594	PUCE-SI	<i>Jaidy Gamba Salas</i>
Gisela Piroano	1500851199	PUCE-SI	<i>Gisela Piroano</i>

Fuente: El autor

Anexo 14. Encuestas



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

Este cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación. Por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA	07 Diciembre 2019		
EXPOSITOR	Angel Acero		
LUGAR	DENTRO PUCESI	<input checked="" type="checkbox"/>	FUERA PUCESI

IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					X
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					Y
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					X
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					Y
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					Y
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					X
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					X
8. ¿Considera Usted que el tema Investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					Y
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					Y
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					PUC - 53

Fuente: El autor

Anexo 15. Permiso del MAE



AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

No. 009-2017-IG-FAU-FLO-DPA/MAE

FLORA FAUNA X

El Ministerio del Ambiente, a través de la Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre Codificada, autoriza a:

Investigadores/ Principales

Investigadores	Nacionalidad	Cedula/ Pasaporte	Título	Registro SENECYT	Función dentro de la Investigación
Tito Jorge Mendoza Cadena	Ecuatoriana	1002802294	Médico Veterinario Zootecnista		Docente Tutor de la Investigación
José Ángel Acero Chamba	Ecuatoriana	1004198899	Estudiante		Tesista

Para que lleve a cabo la investigación científica sobre "Caracterización toxicológica en renacuajos de la rana (*Gastrotheca riobambae*)", de acuerdo a las siguientes especificaciones:

- 1.- Solicitud del: Msc. Tito Mendoza, DOCENTE E INVESTIGADOR DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA.
- 2.- Auspicio de Institución Científica Nacional: PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA.
- 3.- Auspicio de Institución Científica Internacional: No aplica
- 4.- Institución que financia la investigación: No aplica
- 5.- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Unidad de Patrimonio Natural y Responsable de Vida Silvestre.
- 6.- Inicio y final de investigación: 06 de Abril de 2017 hasta el 06 de Noviembre de 2017.
- 7.- Entrega de informe final: 06 de Noviembre de 2017.
- 8.- Valoración técnica del proyecto: Ing. Marcelo Pantoja
- 9.- Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin el correspondiente permiso competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
- 10.- Las muestras no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de bioprospección ni ACCESO A RECURSO GENÉTICO, la competencia de Acceso a Recurso genético es exclusiva del MAE, Unidad de Recursos Genéticos.
- 11.- De los resultados que se desprenda de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente.

Complementos autorizados para llevar a cabo la Investigación en campo

- 12.- Metodología para realizar el estudio de Caracterización toxicológica en renacuajos de la rana (*Gastrotheca riobambae*):
 - Evaluación ecológica rápido, además de control y monitoreo
- Obligaciones del Investigador
- 13.- Entregar al Ministerio del Ambiente-Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura, (02) dos copias del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar formato Informe Final en la Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura). Y adjuntar el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las instituciones científicas ecuatorianas como internacionales depositarias de material biológico.
- 14.- Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colectó el material biológico.
- 15.- Entregar (2) copias de las publicaciones a la Dirección Nacional de Biodiversidad.
- 16.- Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión. (Se respetara los derechos de autoría).
- 17.- Lista taxonómica de las especies de fauna, debidamente identificadas, objeto de la autorización de colecta con sus respectivas coordenadas. (Solicitar Formato en la Dirección del Ambiente de Imbabura).
- 18.- Los holotipos y ejemplares únicos sólo pueden llevarse fuera del país en calidad de préstamo por un periodo de hasta 12 meses. (En caso de requerir más tiempo se deberá realizar la solicitud y entregar informes preliminares).
- 19.- Depositar Holotipos y ejemplares únicos en una institución ecuatoriana depositaria de material biológico, Centros de Manejo y Tenencia de Vida Silvestre, Museo José Julián Andrade, de la Unidad Educativa Teodoro Gómez de la Torre.
- 20.- Las muestras de Fauna, a ser depositadas deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 se responsabiliza al Msc. Tito Mendoza, DOCENTE E INVESTIGADOR DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA.

SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS, CANTONES Y ÁREAS PROTEGIDAS:

Provincia	Cantones	Parroquias o sector
Imbabura	Ibarra	Sagrario y la Esperanza
Áreas Protegidas		
No aplica		

SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL PROPÓSITO DE:

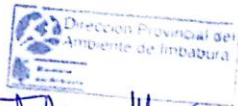
- 21.- Describir los objetivos que se enumeran en el plan de investigación:
 - Evaluar la toxicidad en renacuajos de la rana (*Gastrotheca riobambae*), en función de las concentraciones de N-fosfonometilglicina mediante un análisis de HPLC., para determinación de dosis letal.
 - Identificar áreas específicas en las vertientes de la comunidad la Esperanza mediante una georeferenciación del lugar para la toma de muestras.
 - Analizar las diferentes muestras tomadas HPLC para determinación de las concentraciones en cada una de ellas.
 - Evaluar la toxicología de N-fosfonometilglicina en renacuajos de la especie de rana (*Gastrotheca riobambae*), para la determinación de la dosis letal.
 - Socializar la investigación a grupos relacionados a la conservación de la biodiversidad mediante la coordinación y colaboración de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra y el Ministerio del Ambiente para difundir la información generada.

SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

Materiales/equipos	Materiales/Equipos	Materiales/Equipos	Materiales/Equipos
GPS	Computador	Balanzas de resorte pesola	
Cámara de foto	Calibrador digital en fibra de vidrio	LighLine 10g	
Envases plásticos	Balanzas de resorte pesola LighLine 100g	Conductímetro	
		Potenciometro	

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

- 22.- LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERÁN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO, DESDE EL NÚMERO 001-09-17- IC-FAU-FLO-DPA/MAE HASTA N°-000-09-17-IC-FAU-FLO-DPA/MAE.
- 23.- ESTA AUTORIZACIÓN FACULTA LA COLECCIÓN/ MANIPULACIÓN DE ESPECÍMENES DE FAUNA, MISMO QUE NO PODRÁN SER UTILIZADOS COMO MATERIAL PARENTAL PARA MANEJO COMERCIAL.
- 24.- ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, EN TAL SENTIDO HABILITA EL MANEJO DE FAUNA, QUE HAYAN ESTADO EXPRESADOS EN LA PROPUESTA TÉCNICA TANTO EN TAXONES COMO EN NÚMERO DE INDIVIDUOS.
- 25.- LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECÍMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.
- 26.- PARA EL INGRESO A ÁREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN RESPECTIVA DEL PROPIETARIO O GAD-PROVINCIAL, MUNICIPAL O PARROQUIAL.
- 27.- PARA EL INGRESO A ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO RESPONSABLE DE ÁREA Y ACOMPAÑAMIENTO DE UN GUARDAPARQUE.
- 28.- NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA DE ESTA INVESTIGACIÓN.
- 29.- SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES DEL ESTADO ETÍLICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.
- 30.- ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAÍDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
- 31.- SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
- 32.- TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y DEMÁS NORMATIVAS PERTINENTES.
- 33.- EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
- 34.- TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA 0010000785, CÓDIGO SUBLÍNEA 190499, DEPÓSITO, 461503566 DE BAN ECUADOR, DE FECHA 28-03-2017.



Mgs. Julio César Moran de la Torre
 Director Provincial del Ambiente de Imbabura

SP.

CC: Coordinadores de Patrimonio Natural

Responsables de Vida Silvestre: Ing. Marcelo Pantoja

Fecha: 06-04-2017