



FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

“EFECTOS TÓXICOS DE LOS LIXIVIADOS DE LA MEZCLA DE
COLILLAS DE CIGARRO SOBRE *Daphnia magna* Y *Artemia
franciscana*”

Tesis para optar el título profesional de:

Ingeniero Ambiental

Presentado por:

Bach. Marco Antonio Liza Wong (0000-0002-1378-4794)

Asesor:

Mg. Armando Vélez Azañero (0000-0003-4246-1502)

Lima – Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 09 de marzo de 2021.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dr. José Alberto Iannacone Oliver
Miembro: Dra. Karol Natalie Lavado Solis
Miembro: Mg. Mirtha Rosario Nazario Ramirez

Se reúnen para evaluar la tesis titulada: "EFECTOS TOXICOS DE LOS LIXIVIADOS DE LA MEZCLA DE COLILLAS DE CIGARRO SOBRE *Daphnia magna* Y *Artemia franciscana*"

Presentada por el bachiller:

- Marco Antonio Liza Wong

Para optar el Título Profesional de ingeniera ambiental.

Asesorada por: Mg. Armando Jesus Edilberto Vélez Azañero

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de los estudiantes de la carrera de Ingeniería ambiental en la sustentación, concluyen de manera unánime (x) por mayoría simple () calificar a:

• Tesista: Marco Antonio Liza Wong	Nota (en letras): Dieciocho		
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Dr. José Alberto Iannacone Oliver
Presidente del Jurado



Mg. Armando Jesus Edilberto Vélez Azañero
Asesor



Dra. Karol Natalie Lavado Solis
Miembro del jurado



Mg. Mirtha Rosario Nazario Ramirez
Miembro del jurado

Dedicatoria

A mi padre, quien debe estar dando clases de
Humildad en el cielo; A mi madre, quien fue mi
Apoyo y motor para poder llevar a cabo esta profesión;
A mis hermanos, quienes siempre estuvieron
Y están a mi lado en todo momento vivido, y a todas
Las personas que estuvieron ahí, por el periodo que fuese,
Apoyando mi desarrollo personal y profesional.

Gracias a Uds. Soy quien soy.

Gracias.

Agradecimientos

Agradezco a mi asesor Armando Vélez, quien me dio la mano en un momento difícil para la elaboración de esta tesis. A Grecia Sotil, Ricardo Lion, Gerald Pinto, Beatriz Magallanes, Javier Pujaico y Rosabel Pesantes quienes me apoyaron con materiales, obtención de información y otros, durante el desarrollo del trabajo.

A Henry Obeso, Paul Baltazar, Valeska Caja, Rafael Alvis, Elvis Molero, Carola Salazar y a todo el equipo del laboratorio de Larvicultura y el laboratorio de Ingeniería Ambiental que se encontraba en el periodo 2019- I por apoyarme con la infraestructura, brindarme sus consejos, criterios técnicos y disponibilidad de tiempo.

A toda la familia de Tower And Tower S.A. quienes me brindaron su apoyo y la disponibilidad de tiempo necesaria para poder ejecutar el presente estudio.

Por último, a todos mis familiares y amigos que durante el desarrollo de la investigación me incentivaron cada día a mejorar profesionalmente.

ÍNDICE GENERAL

I.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.1	Formulación del Problema.....	113
1.2	Justificación.....	14
II.	MARCO TEÓRICO	16
2.1	Ecotoxicología	16
2.2	Ensayo biológico	17
2.3	Efectos tóxicos	18
a.	Concentración letal	17
b.	Concentración letal media	18
c.	Concentración efectiva	19
d.	Concentración efectiva media	20
2.4	<i>Evaluación del riesgo ambiental</i>	160
2.5	<i>Daphnia magna</i>	21
2.6	<i>Artemia franciscana</i>	22
2.7	Colillas de cigarro.....	23
2.8	Lixiviado de colillas de cigarro	25
a.	Tabaco.....	26
b.	Nicotina	27
c.	Etilfenol	27
III.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	28
3.1	Objetivos	28
a.	Objetivo General	28

b. Objetivos Específicos	28
3.2 Hipótesis	29
IV. METODOLOGÍA	30
4.1 Estandarizacion de las Colillas de cigarro	30
4.2 Determinacion de la cantidad de unidades de colillas de cigarro utilizados en los ensayos biologicos	30
4.3 Preparacion de agua con lixiviado	32
4.4 Organismos de Prueba.....	34
4.5 Ensayo de toxicidad aguda.....	37
4.6 Procesamiento Estadistico de datos	39
4.7 Evaluacion de Riesgo Ambiental	39
a. Evaluacion de la relacion concentracion efecto (PNEC).....	39
b. Evaluacion de la exposicion (PEC).....	40
c. Caracterizacion del Riesgo.....	40
V. RESULTADOS.....	41
5.1 Determinacion de parametros de control y validacion del test	41
5.2 Ensayo de toxicidad aguda.....	43
5.3 Determinacion del PNEC.....	47
VI. DISCUSIONES	48
VII. CONCLUSIONES	56
VIII. RECOMENDACIONES	57
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
X. ABREVIATURAS	70
Anexo 1	71
Anexo 2	72
Anexo 3	73
Anexo 4	74
Anexo 5	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Toxicidad aguda de los lixiviados de las colillas de cigarro sobre la <i>Daphnia magna</i> despues de 48 h de exposicion.....	44
Figura 2 Toxicidad aguda de los lixiviados de las colillas de cigarro sobre la <i>Artemia franciscana</i> despues de 24 h de exposicion	44
Figura 3 Tratamiento con lixiviados de colillas de cigarro en <i>Daphnia magna</i> ..	75
Figura 4 Tratamiento con lixiviados de colillas de cigarro en <i>Artemia franciscana</i>	75
Figura 5 Cultivo de <i>Chlorella sp.</i> y nutrientes utilizados	76
Figura 6 Recipientes de cultivo de <i>Daphnia magna</i>	76
Figura 7 Cultivo de la <i>Daphnia magna</i>	77
Figura 8 Corte, pesaje y realizacion de lixiviados de colillas de cigarro	77
Figura 9 Procedimiento de eclosion de <i>Artemia franciscana</i>	77

ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 1 Colillas de cigarro en una solucion preliminar al 100%, en agua dura reconstituida, o agua marina declorada; para determinar el numero de unidades de cigarro en el ensayo biologico con <i>Daphnia magna</i> y <i>Artemia franciscana</i>	30
Tabla 2 Mezcla de colillas de cigarro para el test de la <i>Daphnia magna</i>	33
Tabla 3 Mezcla de colillas de cigarro para el test de la <i>Artemia franciscana</i> ...	34
Tabla 4 Parametros de la solucion de agua dura reconstituida.....	42
Tabla 5 Parámetros de solucion de agua de mar declorada	42

Tabla 6 Efecto de los lixiviados de colillas de cigarro sobre la <i>Daphnia magna</i> y <i>Artemia franciscana</i> a 48 h y 24 h de exposicion, respectivamente en porcentaje de supervivencia.....	43
Tabla 7 Parametros determinados en masa y en cantidad de unidades	45
Tabla 8 Cantidad de masa y nicotina lixiviada de colillas de cigarro en la CL50, NOEC y LOEC de <i>Artemia franciscana</i> y <i>Daphnia magna</i>	46
Tabla 9 Prueba de kruskal wallis para <i>Daphnia magna</i> a	71
Tabla 10 Prueba de U Mann Whitney para la <i>Daphnia magna</i>	71
Tabla 11 Prueba de kruskal wallis para la <i>Artemia franciscana</i>	72
Tabla 12 Prueba de U Mann Whitney para la <i>Artemia franciscana</i> a.....	72
Tabla 13 Concentracion de nutrientes del F/2 Algae FOOD Part A y B	73
Tabla 14 Parametros del modelo de distribucion de los resultados de la <i>Daphnia magna</i>	74
Tabla 15 Parametros del modelo de distribucion de los resultados de la <i>Artemia franciscana</i>	75

RESUMEN

Esta investigación determinó el potencial de toxicidad de los lixiviados de la mezcla de colillas de cigarro, de las marcas con mayor participación en el mercado peruano, en *Daphnia magna* (Straus 1820) y *Artemia franciscana* (Kellog 1906). Se realizaron ensayos de toxicidad considerando las recomendaciones estandarizadas para *D. magna* y para la *A. franciscana*. Se utilizó el software TRAP (Toxicity Relationship Analysis Program) para determinar la CL₅₀ (concentración letal media) considerando límites de confianza del 95% y el programa Past 3.2 para determinar la menor concentración que produce efectos observables, (LOEC) y la mayor concentración en la cual no se ve efecto, NOEC. Los resultados mostraron una CL₅₀ de 1.29 ± 0.09 colillas/L (449.7 ± 31.9 mg/L) para la *D. magna* y de 4.27 ± 0.53 colillas/L (1482.54 ± 185.28 mg/L) para la *A. franciscana*. Los parámetros NOEC y LOEC para la *D. magna* fueron de 0.84 colillas/L (293.16 mg/L) y 1.12 colillas/L (389.14 mg/L), respectivamente, y los mismos parámetros para la *A. franciscana* fueron de 2 colillas/L (694.9 mg/L) y 4 colillas/L (1389.8 mg/L), respectivamente. Se estableció la concentración sobre la cual se esperan efectos adversos por parte de las colillas de cigarro (PNEC), cuyo valor para la *D. magna* y la *A. franciscana* fue de 0.001 colillas/L y 0.004 colillas/L, respectivamente. En Perú, se propone que, en agua dulce, las colillas de cigarro no deben sobre pasar los 1.29×10^{-3} colillas/L ($0.45 \times$ mg/L), y en agua de mar las colillas de cigarro no deben sobre pasar los 4.27×10^{-3} colillas/L ($1.48 \times$ mg/L); ya que podría generar daños al ecosistema.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, colillas de cigarro, *Daphnia magna*, Evaluación de Riesgo Ambiental, nicotina, toxicidad.

ABSTRACT

The present investigation determines the potential for toxicity of the leachates from the mixture of cigarette butts (CB's) of the brands with the largest participation in the Peruvian market in *Daphnia magna* (Straus 1820) and *Artemia franciscana* (Kellog 1906). The tests were carried out according to standards to *D. magna* and *A. franciscana*. The software TRAP (Toxicity Relationship Analysis Program) was used to determine the mean lethal concentration (LC₅₀) considering 95% confidence limits and the software Past 3.2 was used to determine the lowest observed effects concentration (LOEC) and no observed effect concentration (NOEC). The results showed a LC₅₀ for *D. magna* of 1.29 ± 0.09 Cigarettes Butts/L (449.7 ± 31.9 mg/L) and for *A. franciscana* was 4.27 ± 0.53 Cigarettes Butts/L (1482.54 ± 185.28 mg/L). The NOEC and LOEC parameters for *D. magna* were 0.84 Cigarette butts/L (293.16 mg/L) and 1.12 Cigarette butts/L (389.14 mg/L), respectively, and the same parameters for *A. franciscana* was 2 cigarette butts/L (694.9 mg/L) and 4 cigarette butts/L (1389.8 mg/L), respectively. Finally, the concentration over which damage to the environment would be expected (PNEC) was established, which values for *D. magna* and *A. franciscana* were 0.001 butts/L and 0.004 butts/L, respectively. In Peru, it is proposed that cigarette butts should not exceed 1.29×10^{-3} cigarette butts/L ($0.45 \times$ mg/L). and, in marine water, cigarette butts should not exceed 4.27×10^{-3} cigarette butts/L (1.48×10^{-3} mg/L); since this could cause damage to the ecosystem.

Keywords: cigarette butt, nicotine, toxicity, *Daphnia magna*, *Artemia franciscana*, environmental risk assessment.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se consumen seis trillones de unidades de cigarro anualmente alrededor del mundo, generándose como residuos las colillas de cigarrillos (Novotny y Zhao, 1999; Granda, Girón y López, 2016). Sólo en Australia, hasta el 2006, se han generado entre 24 billones y 32 billones de colillas de cigarrillos anuales (Micevska *et al*, 2006; Kurmus y Mohajerani, 2020) y, hasta el 2010, entre 4.5 trillones y 5.5 trillones de unidades de colillas de cigarrillos anuales alrededor del mundo (Slaughter, 2010; Montalvao *et al.*, 2019) o, su equivalente en peso, 1'200.000 t de colillas de cigarrillos, cantidad que se espera aumente un 50% para el 2025 (Abdul, 2015). Las colillas de cigarro representan un problema frecuente en la gestión de residuos sólidos al no reconocer sus características de peligrosidad y al no existir una forma adecuada de disponerlas (Rebischung *et al.*, 2018; Montalvao *et al.*, 2019). El BM (2012) concuerda con lo antes mencionado al determinar, a través de su informe, que no hay datos exactos de la disposición final de los residuos producidos hasta ese momento a nivel mundial, pero en la mayoría de países de ingresos medios y bajos, gran parte de sus residuos se disponen en botaderos. Perú confirma este enunciado, con el VI Informe Nacional de Residuos Sólidos de la Gestión del Ámbito Municipal y no Municipal 2013, al comunicar que el 55,17% de los residuos generados a nivel nacional, en donde se incluye las colillas de cigarro, se dispone en lugares inadecuados (MINAM, 2016). Respecto a las colillas de cigarro, la gestión de este residuo se dificulta más con el mal hábito de los fumadores de lanzar sus colillas, generando que estas se acumulen en distintos ambientes y aumentando el

riesgo de que sus lixiviados lleguen a interactuar con su entorno (Abdul, 2011).

La particularidad de las colillas de cigarro es que tardan demasiado tiempo en poder degradarse, se estima que tardarían más de 10 años (Bananomi *et al.*, 2015; July y Coulis, 2018; Kurmus y Mohajerani, 2020) y durante todo ese tiempo liberan cerca de 4000 sustancias que se generan durante la combustión del cigarrillo (Monzonis, 2011) y también las sustancias que se utilizaron en el proceso de producción del cigarrillo (Slaughter; 2010). Otro de los impactos ambientales es la contaminación visual por ser uno de los residuos sólidos más abundantes (Monzonis, 2011).

Esto originó que se lleven a cabo diferentes investigaciones alrededor del mundo para determinar el potencial de toxicidad de las colillas de cigarro. Así encontramos información como la que brindan Register (2000), Warne *et al.* (2002), Micevska *et al.* (2006), Slaughter (2010) y Parker y Rayburn (2017), quienes, por medio de ensayos de toxicidad aguda, concluyeron que la presencia de las colillas de cigarro en ecosistemas marinos o de agua dulce pueden ser capaces de generar daños a las poblaciones con las que lleguen a interactuar, en ocasiones con concentraciones letales medias (CL₅₀) de 0.125 Colillas de cigarro/L. Micevska *et al.* (2006), afirman que la toxicidad que pueden generar los lixiviados de las colillas de cigarro varía en cada marca y no necesariamente por el contenido de nicotina en cada una. Estados Unidos incluyo dentro de la clasificación de residuos sólidos a aquellos que contengan una concentración de nicotina de 1 mg/ Kg de; sin embargo, se encuentra discutiendo la inclusión de los residuos de los

productos de tabaquerías, como los cigarrillos, dentro de su estándar para gestionar residuos farmacéuticos peligrosos (P075); sin embargo, aun considera insuficiente la cantidad de estudios para poder incluirlos en el estándar citado (EPA, 2019). Por otro lado, la unión europea, bajo sus estándares, considera a las colillas de cigarrillo como residuos peligrosos, bajo la característica de peligrosidad HP 6 (toxicidad Aguda) (Rebischung *et al.*, 2018). En el caso de Perú, la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos (D.L. N° 1278) y su respectivo reglamento (D.S. N° 014-2017-MINAM) aun no contempla residuos que contengan nicotina, por lo que no se lleva un control de estos tipos de residuos, a pesar de tener productos de la industria tabacalera.

1.1 Formulación del Problema

¿Cuál es el potencial tóxico de los lixiviados de las colillas de cigarrillo de las cuatro marcas más consumidas en el Perú sobre la *Daphnia magna* y *Artemia franciscana*?

1.2 Justificación

Ambiental

Las colillas de cigarrillos son el principal problema de las playas a nivel mundial ya que su producción aumenta cada año (Novotny y Zhao, 1999;

Micevska *et al.*, 2006; Slaughter, 2010 y Abdul, 2015), generando cambios físicos y químicos en los cuerpos de agua (García *et al.*, 2014). Las colillas de cigarros son residuos tóxicos que podrían afectar toda la cadena trófica (García *et al.*, 2014); Razón por la cual, es importante evaluar la toxicidad por medio de bioensayos para comprender los efectos de estos contaminantes en la calidad del agua y en la diversidad de organismos que esta sostiene; en un contexto donde las investigaciones en este tema aún son escasas e insuficientes (Micevska *et al.*, 2006; Slaughter, 2010; Ashall y Tefera, 2016).

En Perú no existen estudios que detallen los efectos de los lixiviados de las colillas de cigarro en el ambiente; por tanto, esta investigación generara información, direccionada a conocer el impacto de estos contaminantes en los ecosistemas acuáticos, fomentando nuevas alternativas de reducción, valorización y disposición de estos residuos; además de representar nuevas oportunidades de negocio, principalmente incluyéndolos en la fabricación de ladrillos, atenuantes de ruido y/o extracción de pulpa de celulosa (Abdul y Mohajerani, 2010; D'Henri *et al.*, 2017).

Legal

Los Estándares de calidad Ambiental de Perú, consideran parámetros químicos, físicos y microbiológicos para determinar la calidad de los cuerpos receptores en forma general, dejando de considerar que cada lugar tiene distintas condiciones y en ocasiones hasta organismos diferentes. Es por ello que se considera como una herramienta complementaria la utilización de bioensayos para determinar la calidad de los cuerpos receptores.

Los resultados de este trabajo pueden ser considerados por instituciones encargadas de garantizar que el ambiente goce de buenas condiciones,

como el MINAM, ayudando a esclarecer incertidumbres respecto a las características de las colillas de cigarrillos, tal y como lo establece el D.S. N° 014-2017-MINAM que aprueba el reglamento de la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos, y direccionando esfuerzos a la generación de recomendaciones para disminuir o controlar la contaminación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Ecotoxicología

Ecotoxicología es aquella ciencia que, combinando conocimientos de Ecología, Química, Biología, Bioquímica, Fisiología, Estadística, Oceanografía, Limnología y otras disciplinas, se determina los efectos que pueden tener distintas sustancias químicas sobre los organismos, poblaciones y comunidades. Así como la interacción que tiene la sustancia con el entorno y su mecanismo de acción sobre los organismos (Capó, 2007; Bertolletti y Zagatt (2008); Planes y Fuchs (2015). Entre los efectos que se

pueden encontrar están la toxicidad, la alteración de especies, la reducción de la productividad, etc. (Capó, 2007).

Gagne (2014) aumenta aún más el alcance de la ecotoxicología, afirmando que su campo de estudio abarca el destino y efectos de los contaminantes desde el nivel molecular hasta el nivel del ecosistema. Es por esta razón que, según Gagne (2014), la ecotoxicología se subdivide en tres campos: Exposición y biodisponibilidad de los contaminantes, evaluación de la toxicidad de las sustancias con sus mezclas y biomarcadores para determinar el riesgo de polución a largo plazo en organismos y sus correspondientes poblaciones. Además, agrega que los contaminantes no son sólo sustancias químicas sino también pueden ser la radiación, la temperatura y agentes biológicos.

2.2 Ensayo biológico

Es la exposición de un organismo a distintas concentraciones de sustancias, compuestos químicos y mezclas de estos por un determinado periodo de tiempo. Los ensayos también se pueden realizar con muestras ambientales, que generalmente contienen muchas sustancias químicas diferentes, como las aguas residuales domésticas e industriales, los lixiviados, las aguas superficiales o subterráneas, el agua potable, suelos, sedimentos y otros (Planes y Fuchs, 2015).

Castillo (2004), define el ensayo biológico como una herramienta que, bajo condiciones controladas y especificadas, permite determinar las respuestas de los organismos frente a la exposición de agentes químicos y físicos, advirtiéndole que los resultados obtenidos de las especies ensayadas pueden trasladarse a otras especies resaltando el peligro que podría representarles,

pero que no todas las especies pueden ser ensayadas. Solo unas pocas especies que representen funciones ecológicas importantes pueden ser ensayadas. Las pruebas pueden ser agudas o crónicas e incluso se puede considerar el efecto que tienen los organismos expuestos sobre las agentes físicos y químicos, como la degradación microbiana o biodegradación. Después de la exposición se suele medir la proporción de organismos afectados (efecto cuantitativo) o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra.

Cuando se realiza un ensayo de ecotoxicidad, suelen definirlos con los siguientes criterios (Castillo, 2004):

- Duración: Corto, mediano o largo plazo.
- Metodología utilizada para incorporar la muestra al sistema de ensayo: Estático, con renovación, de flujo continuo.
- Propósito para el cual son utilizados: Control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etcétera.

2.3 Efectos tóxicos

Planes y Fuchs (2015) lo definen como la capacidad que tiene una sustancia para generar efectos adversos sobre cualquier organismo, por ejemplo, muerte, inmovilidad, inhibición del crecimiento e inhibición de la reproducción. Estos efectos se originan debido a que el organismo está expuesto a distintas concentraciones de las sustancias tóxicas.

Castillo (2004), complementa lo anteriormente expuesto afirmando que la manifestación de dichos efectos dependerá de las características de

contaminante como la de su concentración, frecuencia de interacción entre el contaminante y el organismo, así como su relación con el ciclo de vida del organismo. Este último influye en la respuesta que tendrá el mismo organismo frente al contaminante ya que el sistema biológico puede contrarrestarlo a partir de reacciones metabólicas, detoxificación, excreción de tóxicos, etcétera.

Castillo (2004), agrega que los efectos no sólo se ven influenciados por las características del contaminante y el sistema biológico, sino también por el medio en el cual se encuentra (en donde se pueden encontrar otros contaminantes), ya que el medio puede afectar las características físicas y químicas del contaminante, como del sistema. Los efectos que se mencionaron anteriormente se pueden clasificar en efectos agudos y crónicos, entre los primeros podemos encontrar la muerte, inmovilidad y la disminución del ritmo cardiaco (Iannacone y Alvariño, 2009). Estos efectos se los podrá encontrar a una determinada concentración, los cuales tomaran el nombre de Concentración Letal, Concentración Efectiva, Menor Concentración que produce Efectos Observables (LOEC, por sus siglas en inglés) y mayor concentración en la cual no se ve efecto (NOEC, por sus siglas en inglés), respectivamente.

a. Concentración letal

Proporción de una sustancia tóxica en Agua, Suelo o Sedimento, que causa la muerte después de un cierto período de exposición (AET, 1995; Castillo, 2004).

b. Concentración letal media (CL₅₀)

Según Planes y Fuchs (2015), “es la concentración del tóxico que mata al 50% de los individuos expuestos”.

c. Concentración efectiva

La AET (1995) lo define como la proporción de una sustancia en un medio que causa un determinado efecto en un sistema dado.

d. Concentración efectiva media

La Asociación Española de Toxicología (1995) lo define como la concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas.

2.4 Evaluación del riesgo ambiental

La evaluación de riesgo ambiental (ERA) sirve para poder determinar si una sustancia puede considerarse segura para su aplicación o para clasificar a tal como peligroso; también ayuda a precisar los posibles impactos al ambiente por lo que es una herramienta importante para toma de decisiones y manejo de riesgos ambientales (Ize *et al.*, 2010; Hickey 2010). La Evaluación de Riesgo Ambiental se basa en tres componentes: el PNEC (Evaluación de la relación concentración-efecto), que es la concentración por debajo de la cual no se esperan efectos adversos, el PEC (Evaluación de la exposición), que es la concentración que se estima en el ambiente, y la

caracterización del riesgo, que es la relación entre el PEC y el PNEC. Si la caracterización del riesgo supera el valor de uno (01), la sustancia u elemento evaluado puede generar un gran riesgo de causar daños al ambiente (UNEP/IPCS, 1999).

2.5 *Daphnia magna*

La *D. magna* es un miembro de la clase crustácea, dentro del grupo de cladóceros; mide entre 0,2 mm y 5 mm de largo, mientras nadan parecen dar saltos como las pulgas comunes, viven en todo tipo de agua dulce, la mayoría del cuerpo está cubierto por un carapacho con una abertura ventral donde se alojan cinco o seis patas, tienen ojos compuestos, antenas y un par de pelos abdominales. El carapacho suele ser transparente y se puede llegar a ver a través del microscopio el tubo digestivo, el corazón (que late alrededor de 200 veces por minuto a los 20°C, disminuyendo su frecuencia al disminuir la temperatura) y los corpúsculos sanguíneos circulando. Suele alimentarse filtrando del agua algas unicelulares, detritos orgánicos, protistas, bacterias y en algunos casos de crustáceos más pequeños (Ebert, 2005; Barcat, 2009). Son uno de los organismos más utilizados para las pruebas de toxicidad. Entre los principales criterios que se consideran para utilizarlo como organismo de prueba son la amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen como consumidores primarios en la cadena trófica de cuerpos de agua dulce, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogénica (donde los genes provienen solo de la madre y garantiza la uniformidad de las respuestas) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías (Castillo, 2004 y Ebert, 2005).

Debido a su utilización universal se ha generado una amplia gama de información respecto a sus distintas características, como las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes. Es una de las especies que más se les ha hecho interactuar con distintas sustancias tóxicas, por lo que también hay abundante información de su respuesta al ser expuesta a estos. El motivo por el cual se le suele exponer a esta variedad de sustancias químicas es para poder determinar sus letalidades potenciales cuando se encuentra en estado puro, en las aguas residuales domésticas e industriales, en lixiviados, en aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros (Castillo, 2004).

2.6 Artemia franciscana

La *A. franciscana* es un crustáceo Branquiópodo con una gran extensión en el mundo, el cual puede llegar a medir 10mm. Su cuerpo muestra una ligera transparencia y toma un color rojo, rosado o verdoso. Sus poblaciones están compuestas de hembras y machos por lo que su reproducción es sexual, pero en algunas ocasiones cuando en las poblaciones hay un mayor porcentaje de hembras la reproducción puede ser asexual, por medio de la partenogénesis. Su dispersión alrededor del mundo, en su mayoría, se ha llevado a cabo por medio del viento y las aves acuáticas, pero el hombre también ha tenido una gran importancia en su dispersión, principalmente en América y Australia, ya que las empezaron a utilizar en la acuicultura por su alto valor nutritivo. Se alimenta principalmente de microalgas y materia orgánica particulada, no mayor a 50 μm (Cisneros, 2002; Cisneros y Vinetea, 2009; Ministerio de Agricultura, 2009). En Perú existe información sobre la presencia de *Artemia* en diferentes lugares que van desde Tumbes hasta las

cercanías de Chilca, principalmente los lugares que poseen un clima tropical y subtropical con una gran presencia cloruro de sodio. La *A. franciscana* puede soportar un amplio rango de diferentes condiciones, por esta razón se la considera euriterma (amplios rangos de temperatura), eurihalina (amplios rangos de salinidad) y euroxibionte (amplios rangos de niveles de oxígeno), respecto al pH no se conoce la influencia que puede tener en juveniles y adultos, pero puede afectar la eficiencia de la eclosión de quistes si es que su valor se encuentra por debajo de ocho (Cisneros, 2002).

Los mecanismos de adaptación que más se resaltan en la *A. franciscana* son la osmorregulación, a la cual se le atribuye su gran capacidad de soportar amplios rangos de salinidad; los pigmentos de respiración, al cual se le atribuye su gran capacidad de tolerar diferentes niveles de concentración de oxígeno disuelto, y por último la oviparidad, la cual ha preservado la especie por miles de años ya que permite que los quistes de *Artemia* permanezcan en estado de diapausa por muchos años (Cisneros, 2002). Este último mecanismo de adaptación es una de las principales razones por la cual se le selecciona como organismo de prueba en los bioensayos, además de ser barato, simple y de conocerse muy bien su ciclo de vida, ya que asegura la disponibilidad de la *Artemia* en cualquier momento y en cualquier lugar y sus resultados son considerados como criterio para la biota marina (Vanhaecke y Persoone, 1984; Iannacone y Maguiña, 2000).

2.7 Colillas de cigarro.

Las colillas de cigarro son los desechos que quedan al terminar de consumir el cigarro, generalmente están acompañados de papel y tabaco remanente (Slaughter, 2010). Están compuestos principalmente por acetato de celulosa

que se obtiene a partir de una reacción de acetilación entre la celulosa y el anhídrido acético (Pérez *et al.*, 2014), lo cual le da su peligrosidad por la acumulación de sustancias tóxicas (D’Heni *et al.*, 2017; Novotny *et al.*, 2009), y persistencia ya que tarda demasiado tiempo en poder degradarse, solo el 37,8% se desintegra después de dos años (Bananomi *et al.*, 2015). El acetato de celulosa se lo puede encontrar dentro de los filtros con una apariencia de hilos delgados (de 20 μm de diámetro aproximadamente), como si fuesen algodón y unidos por triacetato de glicerol (Slaughter, 2010; APYMA, 2016). La principal función del filtro es retener la mayor cantidad de sustancias que lleva el tabaco y las que suelen producirse al combustionar el cigarro, como el alquitrán, el cadmio, arsénico, nicotina, tolueno, metanol, ácido acético, amoníaco, ácido esteárico, etcétera (APYMA, 2016; Slaughter, 2010).

Otro elemento importante en el cigarro es el papel, ya que la porosidad que posee determinará el flujo de aire a través del filtro. Los cigarrillos que se venden regularmente suelen tener una envoltura no muy porosa, esto para inhibir el flujo de aire a través del filtro, mientras que los cigarrillos “light” suelen tener envolturas más porosas para proporcionar un mayor flujo de aire a través del filtro. El flujo de aire influye mucho en la producción de humos, por lo que, a mayor flujo de aire, menor es la producción de humos y a menor flujo de aire mayor es la producción de humo. El papel de cigarro también contiene diferentes sustancias químicas para mantener la combustión del cigarro, como el acetato de sodio y colas para mantener el papel unido (Slaughter, 2010).

Por otro lado, Slaughter (2010) menciona que las principales sustancias químicas liberadas al ambiente por parte de las colillas de cigarrillos son el

arsénico, metales pesados, nicotina e hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAP'S).

El Año 2017, en Perú y otros ocho países, se realizó una iniciativa ciudadana llamada “HAZla por tu playa” coorganizada con L.O.O.P. (Life Out of Plastic) y Conservemos por Naturaleza, en alianza estratégica con el Ministerio del Ambiente, en la cual un grupo de voluntarios, todos los primeros fines de semana de marzo, limpiaban las playas, pantanos, puertos fluviales, ríos y mares a lo largo y ancho de la costa, sierra y selva de los países, recolectando todo tipo de residuos. Dentro de las 84 toneladas recolectadas, la mayoría correspondía a los plásticos y a las colillas de cigarrillos (Exactamente, 10 626 unidades), situación que alarmó mucho debido a que estos residuos no suelen degradarse completamente, formando microplásticos, reemplazando al fitoplancton y siendo ingeridas por los peces (L.O.O.P. y Conservemos por Naturaleza, 2017). Slaughter (2010), afirma que el 80% de estos residuos provienen de fuentes terrestres.

2.8 Lixiviados de colillas de cigarro.

Los lixiviados son líquidos que se generan por la liberación del exceso de agua contenido, en este caso, en un residuo. El agua que se libera pudo haber sido de origen pluvial o de cualquier otro medio con el cual haya interactuado el residuo, arrastrando consigo todos los componentes que pueden disolverse en el agua. Los lixiviados tienen una gran capacidad para hacer interactuar sus componentes con el medio, siendo esta la principal razón por la que se le considera uno de los principales contaminantes generados en los rellenos sanitarios (Corena, 2008). En el caso de las colillas de cigarro, los compuestos que pueden lixivarse son los que contiene el

tabaco remanente y los que retuvo el acetato de celulosa. Entre estos elementos encontramos los metales pesados (Micevska, 2006), la nicotina y el Etilfenol. Estos dos últimos como los más importantes (Slaughter, 2010).

a. Tabaco

El tabaco, *Nicotina tabacum*, es un miembro de la familia de las solanaceae. *N. tabacum* es la especie utilizada para la fabricación de los cigarrillos, estimándose una cantidad del 80% de su producción para la industria del tabaco. Toma importancia para las instituciones mundiales de la salud, debido a que la cantidad de los químicos que contiene naturalmente, los químicos utilizados para su crecimiento y los agregados para la manufactura de cigarrillos. En total llegan a contabilizarse 4 000 de los cuales se han identificado 23 carcinogénicos (Slaughter, 2010).

Las sustancias químicas antes mencionadas han sido caracterizadas e identificadas previamente a ser fumado el cigarrillo, pero muchas de ellas cambian al ser combustión. Por ejemplo, los productos de la combustión de aminoácidos y el extracto de raíz de ragaliz son sustancias carcinogénicas y esto es solo mencionando productos de la combustión de dos sustancias, en realidad se estima que se pueden superar las 4000 sustancias producto de la combustión del cigarrillo, de los cuales 50 son carcinogénicas para humanos. El alquitrán y la nicotina, que también se encuentran después de la combustión, son el material particulado que se puede encontrar en el humo del cigarrillo y

también está compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas que son consideradas carcinogénicas (Slaughter, 2010).

b. Nicotina.

Según Slaughter (2010), el tabaco aproximadamente contiene el 0.6% - 3% de su peso seco total en nicotina. El uso de la nicotina proviene desde los inicios del siglo XV, donde su principal uso era de pesticida. Los efectos que puede causar a la salud de las personas ya han sido demostrados por muchos estudios, donde también mencionan las rutas por las cuales puede ser incorporado al cuerpo, entre los que encontramos la vía dermal, oral e inhalación. EL cigarro produce aproximadamente entre 1 mg y 2.3 mg de nicotina. Además, Slaughter (2010) afirma que los estudios que se estuvieron realizando hasta el año 2007 encontraron un incremento de la cantidad de nicotina que contienen los cigarrillos. Este aumento progresivo tiene un ratio de 1.6% anualmente. El grupo amino influye en su toxicidad, es por esta razón que se lo utilizaba como insecticida (Micevska *et al.*, 2006).

c. Etilfenol

El etilfenol es una sustancia utilizada como saborizante en la industria del tabaco, pero en otras industrias se suele utilizar para la producción de fármacos, resinas y barnices. El etilfenol puede concentrarse en los organismos acuáticos y puede tener efectos agudos si se encuentra en grandes concentraciones en el medio o

si son grandes dosis, pero cuando se analiza el humo de cigarro solo se puede encontrar una concentración no mayor a los 10 mg (Ashall y Tefera, 2016). Esto, según slaughter (2010), no puede eliminar al etilfenol como un agente potencialmente toxico, ya que el acetato de celulosa ha demostrado tener una gran eficiencia al remover etilfenol del humo de cigarro, por lo que el etilfenol se podría encontrar en mayor concentración dentro de las colillas de cigarro.

III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1 Objetivo general

Determinar el potencial de toxicidad de los lixiviados de la mezcla de las colillas de cigarro de las cuatro marcas más consumidas en el Perú sobre la *D. magna* y *A. franciscana*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el potencial de toxicidad de los lixiviados de la mezcla de las colillas de cigarro, de las cuatro marcas más consumidas en el Perú, para causar la muerte del 50% de la población de la *D. magna* en un tiempo de exposición de 48 h, en g y unidades de colillas de cigarro.

- Determinar el potencial de toxicidad de los lixiviados de la mezcla de las

colillas de cigarro, de las cuatro marcas más consumidas en el Perú, para causar la muerte del 50% de la población de la *A. franciscana* en un tiempo de exposición de 24 h en g y unidades de colillas de cigarro.

- Establecer la concentración sobre la cual se evidenciaría daños al ambiente (PNEC) en cuerpos de agua de mar y de agua dulce.

3.3 Hipótesis

Ho: El aumento de la concentración de los lixiviados de la mezcla de las colillas de cigarro, de las cuatro marcas más consumidas en el Perú, no causara efectos letales en *D. magna* y *A. franciscana*.

Ha: El aumento de la concentración de los lixiviados de la mezcla de las colillas de cigarro, de las cuatro marcas más consumidas en el Perú, causara efectos letales en *D. magna* y *A. franciscana*.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Estandarización de las colillas de cigarro

Para evitar la variabilidad en los resultados, se estandarizó una dilución considerando una mezcla con las colillas de cigarro de las cuatro marcas más consumidas en el mercado peruano, y sus cantidades siguieron las

preferencias de su consumo a nivel nacional (25.1% Pall Mall, 29.4% Lucky Strike, 29.9% Hamilton, 5.1% Marlboro y 10.5% otros; Euromonitor, 2017). Para efectos de esta investigación se consideró a la marca Marlboro con el porcentaje de 15.6% que representó también a las marcas menos consumidas (otros). Por otro lado, los productos elegidos para la experiencia correspondieron a las variantes de mayor demanda: Pall Mall Blue, Hamilton, Lucky Strike Click and Roll y Marlboro.

4.2 Determinación de la cantidad de unidades de colillas de cigarro utilizados en los ensayos biológicos.

Para determinar la cantidad de unidades (colillas de cigarro) necesarias para la prueba final; se elaboró una prueba preliminar, que consistió en seis diferentes concentraciones de colillas de cigarro. La concentración de 100% (Tabla 1) representó una mezcla de 1L de disolución (1L de agua reconstituida para *D. magna*, o 1L de agua marina de clorada para *A. franciscana*) y 16 colillas de cigarro (con un cm de tabaco remanente) como soluto; a partir de esta concentración se realizaron las disoluciones para 10%, 1%, 0.1% y 0.01%.

Tabla 1. Colillas de cigarro en una solución preliminar al 100%, en agua dura reconstituida, o agua marina de clorada; para determinar el número de unidades de cigarro en el ensayo biológico con *Daphnia magna* y *Artemia franciscana*.

<i>Pall Mall Blue</i>	<i>Lucky Strike Click And Roll</i>	<i>Marlboro</i>	<i>Hamilton</i>	<i>Total</i>
-----------------------	------------------------------------	-----------------	-----------------	--------------

<i>Cantidad de Unidades</i>	4.02	4.70	2.50	4.78	16
<i>Masa promedio de colillas (g).</i>	0.31	0.39	0.38	0.32	-
<i>Masa promedio del tabaco remanente sin filtro (g)</i>	0.14	0.19	0.18	0.15	-
<i>Masa Promedio del filtro sin tabaco remanente (g)</i>	0.17	0.2	0.2	0.17	-
<i>Masa total promedio de colillas (g)</i>	1.26	1.83	0.95	1.52	5.56
<i>Masa total promedio de tabaco remanente sin filtro (g)</i>	0.58	0.88	0.45	0.71	2.62
<i>Masa total promedio de colillas de cigarro sin tabaco remanente(g)</i>	0.68	0.94	0.50	0.81	2.97

Para la *D. magna* la prueba preliminar consistió en colocar 10 neonatos en recipientes de acrílico con 30mL de cada una de las concentraciones; 24 h después de haber iniciado el ensayo se registró el número de organismos muertos. De esta forma se registró las concentraciones que provocaron el 0% y 100% de mortalidad (Castillo, 2004).

Para la *A. franciscana*, la prueba preliminar consistió en colocar 10 nauplios del II estadio en recipientes de acrílico con 10mL de cada una de las concentraciones; 15 h después de haber iniciado el ensayo, se registró el número de organismos muertos. De esta forma se registró las concentraciones que provocaron el 0% y 100% de mortalidad (Vanhaecke y Persoone, 1984; Iannacone, *et al.*, 2016).

Las pruebas preliminares dieron como resultado el uso de dos unidades de colillas de cigarro para 1L de agua dura reconstituida en el caso de *D. magna*, y 16 unidades de colillas de cigarro en 1L de agua marina declorada para el caso de *A. franciscana*.

4.3 Preparación de agua con lixiviado

Para el test de *D. magna* los lixiviados de las colillas de cigarro se prepararon adaptando la metodología de Micevska *et al.* (2006). Se mezclaron dos unidades de colillas de cigarro (Tabla 2) en un matraz de 1L conteniendo 1L de agua dura reconstituida (capítulo 4.4.) y un agitador magnético que rotaba a 125 rpm. La agitación se realizó por un periodo de 24 h. Los cigarrillos fueron fumados artificialmente utilizando una botella de 1 L cortada desde la base y una tina llena de agua, la cual fue utilizada como embolo. Se utilizó el mismo tapón de la tapa de la botella para colocar los cigarrillos encendidos, debido a que este tapón cuenta con un agujero del diámetro del filtro del cigarro; la botella se sumergía desde la base cortada hasta que el agua llegaba al cuello de la botella; para posteriormente sellar el extremo de la botella con la chapa y el cigarro acoplado en esta. Una vez sellada la botella, se procedía a elevar la botella lentamente para que, con el agua, se creara una succión dentro de la botella y así simular la acción de inhalar por parte de los fumadores. Esta actividad se repitió hasta consumir el cigarro 1 cm antes de que se llegue al filtro.

Para el test de la *A. franciscana* los lixiviados de las colillas de cigarro se

prepararon adaptando la metodología de Micevska *et al.* (2006). Se colocó una mezcla de colillas de cigarros equivalente a 16 unidades (Tabla 3) en un matraz de 1 L conteniendo 1 L de agua de mar declarada, proveniente del laboratorio de larvicultura de la Universidad Científica del Sur, y, agitado con un agitador magnético que rotaba a 125 rpm, se procedió a producir los lixiviados. Los cigarros fueron fumados artificialmente con el mismo procedimiento que se detalló para los lixiviados usados en el test de la *D. magna*.

Tabla 2. Colillas de cigarro en una solución final al 100%, en agua dura reconstituida, del ensayo biológico de la *Daphnia magna*.

	<i>Pall Mall Blue</i>	<i>Lucky Strike Click And Roll</i>	<i>Marlboro</i>	<i>Hamilton</i>	<i>Total</i>
<i>Cantidad de Unidades</i>	0.50	0.59	0.31	0.60	2
<i>Masa total promedio de colillas (g).</i>	0.16	0.23	0.12	0.19	0.70

Tabla 3. Colillas de cigarro en una solución final al 100%, en agua dura reconstituida, del ensayo biológico de la *Artemia franciscana*.

	<i>Pall Mall Blue</i>	<i>Lucky Strike Click And Roll</i>	<i>Marlboro</i>	<i>Hamilton</i>	<i>Total</i>
<i>Cantidad de Unidades</i>	4.02	4.70	2.50	4.78	16

<i>Masa total promedio de colillas (g).</i>	1.26	1.83	0.95	1.52	5.56
---	------	------	------	------	------

4.4 Organismos de prueba

Daphnia magna

Se obtuvo hembras adultas de *D. magna* del acuario Cleo, las cuales fueron transportadas en recipientes de 3 L de plástico hasta el laboratorio de larvicultura de la Universidad Científica del Sur (LLCS). En el laboratorio de larvicultura se procedió a acondicionar los organismos en recipientes de 2 L de capacidad conteniendo agua dura reconstituida con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, la iluminación se realizó con un fluorescente LEDVANCE de 800 LUM y 600 lux de intensidad en la superficie del agua. Se aireó suavemente los recipientes a una temperatura de 22°C. La densidad utilizada fue de 10 organismos/L para evitar estrés en los organismos (EPA, 2018).

El agua dura reconstituida se preparó utilizando Sulfato de magnesio (1.2 g), Bicarbonato de sodio (1.91999 g), Cloruro de potasio (0.08000 g) y Sulfato de calcio (1.2 g) y 10 litros de agua Tri Desionizada o ultra pura (0.055 µS/cm). La preparación se realizó tal y como estipula el protocolo de la EPA (2018), el cual consiste en diluir en 9.5 L de agua las tres primeras sales mencionadas y en 0,5 L el Sulfato de calcio. Al terminar de diluir las sales, estas dos soluciones se mezclaron y se oxigeno por 24 h antes de ser usado como medio de cultivo. Antes de usar el medio se realizó medidas de pH (7,39), Temperatura (22 °C), oxígeno disuelto (7,74 ppm) y conductividad (0,65 m/S). También se hicieron pruebas de

control de este, el cual consistió en poner 30 neonatos de *D. magna* en recipientes de 30 mL conteniendo el medio recientemente preparado (10 en cada uno) y al cabo de 48 h se observó la mortalidad de los neonatos, la cual no debió superar el 10 % (Castillo *et al*, 2004). *D. magna* fue alimentada con la microalga *Chlorella* sp. La microalga fue cultivada en las instalaciones del laboratorio de larvicultura, utilizando 2 L de agua de grifo y la misma cepa que se utiliza en el mismo laboratorio.

Al recipiente, que contenía el agua de grifo con las algas, se le oxígeno fuertemente y se le agregó 1 mL de F/2 Algae Food Part A y 1 mL de F/2 Algae Part B, ambos de la marca ProLine (Anexo 3.). Para establecer la cantidad de cultivo algal que se suministró a cada recipiente de cultivo; primero se determinó la concentración de microalgas, utilizando una cámara de Neubauer, y posteriormente se utilizó la siguiente fórmula (Castillo *et al*, 2004):

$$V=(AxB)/C$$

Donde:

V= Volumen del concentrado algal

A= Numero de Daphnias por acuario

B= Dosis optima recomendada ($1,5 \times 10^6$ células por daphnia/dia)

C= Concentración (número de células.mL⁻¹) de la suspensión de algas (para su determinación se usa cámara de newbauer)

En promedio la concentración de *Chlorella* sp. suministrado, en el medio de cultivo de la *D. magna*, fue de 1.560625×10^6 Células.mL⁻¹. Al cabo de ocho días los organismos adaptados tuvieron los primeros neonatos, los cuales fueron puestos en recipientes individuales para hacer el control de calidad, respecto al ciclo de vida (tiempo tardado en alcanzar la madurez sexual y longevidad), obteniendo por cada una de las *D. magna* hembras adultas un promedio de 7 - 10 neonatos en las primeras 2 semanas y 15 – 18 neonatos las siguientes. También tuvieron una longevidad de 29 días. El control de los organismos se realizó todos los días para evitar que no se formen Epifias (reproducción sexual de las daphnias), por medio del estereoscopio. El medio de cultivo era renovado todos los días sábado de la semana.

Artemia franciscana

Quistes de *A. franciscana* fueron obtenidas en el acuario Cleo, ubicado en el distrito de Lince, Lima, Perú. Se trasladaron hasta el laboratorio de Larvicultura de la Universidad Científica del Sur; donde se colocaron 10 g de quistes de *A. franciscana* en un vaso de precipitado de 500 mL conteniendo agua tri-desionizada y a luz intensa (entre 500 y 1000 lux) por 1 h; luego se le adicionó lejía Clorox® (5.25%), a una concentración física 1/10 en agua tri-desionizada; se agitó continuamente y se observó el cambio de coloración de los huevos, siendo lavados luego en un tamiz de 45 µm. Cuando se observó que más del 50% de los huevos de coloración marrón inicial cambiaron a coloración naranja, se lavaron bien

y se trasladaron a un matraz de 1 L conteniendo agua de mar, a un pH = 8, agregándole bicarbonato de sodio (7,5g/L) y finalmente se llevaron a una incubadora a 27°C por 24h. Al término del tiempo mencionado los huevos fueron sometidos a una fuerte aireación hasta su eclosión a temperatura ambiente (19°C – 25°C), dos días después de dar inicio la fase de aireación. Los nauplios del II estadio con 24 h. de haber eclosionado, se utilizaron en la prueba de toxicidad aguda, fueron seleccionados al diferenciar la perforación anal que está ausente en el nauplio I y la ausencia del sistema digestivo lineal que se encuentra en el nauplio III (Iannacone y Maguiña 2000; Carballo, *et al.*, 2003 Iannacone *et al.*, 2016).

4.5 Ensayo de toxicidad aguda

Siguiendo el protocolo de la EPA (2018) para el ensayo con *D. magna*, cada test fue llevado a cabo con seis concentraciones que descendían geométricamente desde la concentración más alta (100% = 2 colillas de cigarro/L) a razón de 0,75 y un control negativo, con cuatro replicas. Los neonatos de *D. magna*, con menos de 24 h de haber nacido, se incorporaron en cada recipiente del ensayo, fueron 10 por cada recipiente de 25 mL de solución por un tiempo de 48 h. Para evitar la variación de la concentración de los contaminantes provenientes de las colillas se colocó un film en la superficie para evitar la evaporación del agua. El pH, la Temperatura, la conductividad y el contenido de oxígeno disuelto se registraron en la última repetición de cada concentración al inicio (0 h.) y al final (48 h) del ensayo (tabla 2). Se usó la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco como criterios de mortalidad. Antes de efectuar las lecturas se agito los

envases para estimular a la *D. magna* y responda con movimientos en caso se hayan depositado en el fondo. Los ensayos fueron considerados válidos cuando la mortalidad en el control negativo no superara el 10% (Castillo, 2004; Persoone *et al.* 2009; Torres y Quintero, 2010).

Para el Ensayo con *A. franciscana* la prueba siguió el procedimiento de Iannacone y Maguiña (2000) y Iannacone *et al.* (2016), considerando recomendaciones de Vanhaecke y Persoone (1984), el cual consiste en dejar pasar 18 h después de la eclosión de los quistes, para su posterior uso en el ensayo. Al pasar el tiempo que se mencionó anteriormente se colocarán 10 de los nauplios del II estadio (el volumen que contengan las pipetas que trasladan los nauplios no debe exceder los 0,05 ml) en recipientes de 25 mL de cada una de las 5 concentraciones, las cuales descendían geométricamente desde la concentración más alta (100% = 16 colillas de cigarro/L) a razón de 0.5, y un control negativo, los cuales contarán con cuatro réplicas. A las 24 h de exposición se contará el número de larvas muertas en cada una de las diluciones. Los ensayos serán considerados válidos cuando la mortalidad en el control negativo no sea mayor al 10%.

4.6 Procesamiento Estadístico de datos

Para los test de la *D. magna* y *A. franciscana*, los valores de las CL_{50} y sus límites de referencia con 95% de confianza se determinaron por medio del programa Toxicity Relationship Analysis Program (TRAP), que utiliza el método numérico Newton Raphson (EPA, 2016). Con el programa PAST se determinó el NOEC y el LOEC, identificando las diferencias significativas entre los tratamientos, para cada especie, aplicando el método de Kruskal-

Wallis y posteriormente el método Mann-Withney para los tratamientos con diferencias significativas (Hammer *et al*, 2001).

4.7 Evaluación del Riesgo Ambiental

Para determinar el riesgo ambiental aproximado se siguió las recomendaciones del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y el Programa Internacional sobre seguridad Química (1999), donde se determinan 3 componentes:

a. Evaluación de la relación concentración efecto (PNEC)

Que es la concentración sobre la cual el las sustancias podrían causar un daño al ambiente. Este se suele determinar a través de la concentración letal media (CL₅₀), la concentra máxima en la que no observan efectos (NOEC) o la concentra mínima en la cual se observan efectos (LOEC), a los cuales se les aplicara un factor de evaluación. Este factor de evaluación fue de 1000 y se aplicó a la CL₅₀ de la *D. magna* y de la *A. franciscana* (UNEP y ICPS, 1999). Se estimó la cantidad de nicotina que se pudo lixiviar en el medio; para esto, se consideró que una colilla de cigarro, sin tabaco remanente, puede lixiviar 0,22 mg/g de nicotina, mientras que el tabaco remanente puede lixiviar entre el 81% y 95% del contenido total de nicotina. El contenido total de nicotina se consideró como el 1.5% del peso seco del tabaco, según la concentración media de las 20 marcas con mayor participación en el mercado de los Estados Unidos (Kozlowski *et al*, 1998; Green *et al*, 2014).

b. Evaluación de la exposición (PEC)

Que es la concentración que se estima en el ambiente, puede ser tomado del ambiente o puede ser calculado inicialmente de documentos elaborados por parte de la industria o cifras obtenidas de otras organizaciones e investigaciones. El presente estudio hizo uso de esta última fuente de información (UNEP y ICPS, 1999).

c. Caracterización del Riesgo

La caracterización del riesgo involucra las evaluaciones de exposición (PEC) y las evaluaciones de concentración – Efecto (PNEC). Si la PEC es mayor a la PNEC o la relación $PEC/PNEC > 1$, significaría que la sustancia puede generar riesgos de daño al ambiente (UNEP y ICPS, 1999).

V. RESULTADOS

5.1. Determinación de parámetros de control y validación de los test

En el medio de agua dura reconstituida, los tratamientos, a las 0 h, iniciaron con una concentración superior a los 7.68 ppm; sin embargo, al finalizar el ensayo, a las 48 h, se evidenció una reducción en la concentración de oxígeno; siendo el control la que mayor reducción mostró al finalizar con una concentración de 6.2 ppm (Tabla 4). En los tratamientos para la *D. magna*, la reducción de la concentración de oxígeno es menor, mientras se aumenta la concentración de colillas de cigarro (Tabla 4). En el medio salino los tratamientos, a las 0 h, iniciaron

con una concentración superior a los 7.72 ppm; sin embargo, al finalizar el ensayo, a las 24 h, se evidencio una reducción en la concentración de oxígeno, siendo el control la que mayor reducción mostro al finalizar con una concentración de 6.9 ppm (Tabla 5). En los tratamientos para la *A. franciscana*, el comportamiento de la concentración del oxígeno es similar al de la *D. magna*, mientras se aumente la concentración de colillas de cigarro, la reducción de la concentración de oxígeno es menor (Tabla 5).

Tabla 4. Parámetros físicos y químicos de los distintos tratamientos con colillas de cigarro en agua dura reconstituida para el ensayo con *Daphnia magna*

	pH		Temperatura (°C)		Oxígeno Disuelto (ppm)	
	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
control	7.39	7.39	22	22	7.73	6.2
23.68	6.95	6.94	22	22	7.65	6.4
31.64	6.93	6.95	22	22	7.68	6.37
42.188	6.89	6.88	22	22	7.72	6.7
56.26	6.89	6.89	22	22	7.68	6.75
75	6.88	6.89	22	22	7.7	7.21
100	6.87	6.88	22	22	7.7	7.67

Tabla 5. Parámetros físicos y químicos de los distintos tratamientos con colillas de cigarro en agua de mar dechlorada para el ensayo con *Artemia franciscana*

	pH		Temperatura (°C)		Oxígeno Disuelto (ppm)	
	0h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
control		7.81	22	22	7.72	6.9
6.25	7.9	7.9	22	22	7.72	6.88
12.5	7.8	7.8	22	22	7.72	7.4
25	7.5	7.7	22	22	7.72	7.3
50	7.5	7.5	22	22	7.74	7.2
100	7.2	7.2	22	22	7.72	7.6

5.2. Ensayos de toxicidad aguda

El valor de la CL50 para la *D. magna* fue de 64.72% (1.29 Colillas/L) y el obtenido por la *A. franciscana* fue de 26.67% (4.27 Colillas/L), siendo este último 0.3 veces menos sensible a los lixiviados de las colillas de cigarro (Tabla 6 y 7). El valor del NOEC y LOEC para la *D. magna* es de 42.19% (0.84 Colillas/L) y 56.25% (1.12 Colillas/L), respectivamente, y para la *A. franciscana* es de 12.5% (2 Colillas/L) y 25% (4 Colillas/L), mostrando a la *D. magna* como la especie que muestra mayor sensibilidad a bajas concentraciones (Tabla 6 y 7).

Tabla 6. Efecto de los lixiviados de colillas de cigarro sobre *Daphnia magna* y *Artemia franciscana* a las 48 h y 24 h, respectivamente en porcentaje de supervivencia.

<i>Daphnia magna</i>			<i>Artemia franciscana</i>		
Tratamiento	% Supervivencia 48 h	Sig.	Tratamiento	% supervivencia 24 h	Sig.
0	100	a	0%	100	a
23.68	97.5	a	6.25%	97.5	a
31.64	95	a	12.50%	92.5	a
42.19	90	ab	25%	35	b
56.25	52.5	bc	50%	5	cd

75 100	32.5 0	c d	100%	0	d
CL₅₀ LOEC NOEC	64.72% 56.25% 42.19%		CL₅₀ LOEC NOEC	26.67% 25% 12.5%	
CL₅₀ (Colillas/L)	1.29 ± 0.09		CL₅₀ (Colillas/L)	4.27 ± 0.53	
CL₅₀ (mg/L)	449.7 ± 31.9		CL₅₀ (g/L)	1482.54 ± 185.28	
NOEC (Colillas/L)	0.84		NOEC (Colillas/L)	2	
NOEC (mg/L)	293.16		NOEC (g/L)	694.9	
LOEC (Colillas/L)	1.12		LOEC (Colillas/L)	4	
LOEC (mg/L)	389.14		LOEC (g/L)	1389.8	

SIG: significancia. Letras iguales en sentido vertical señala promedios estadísticamente iguales

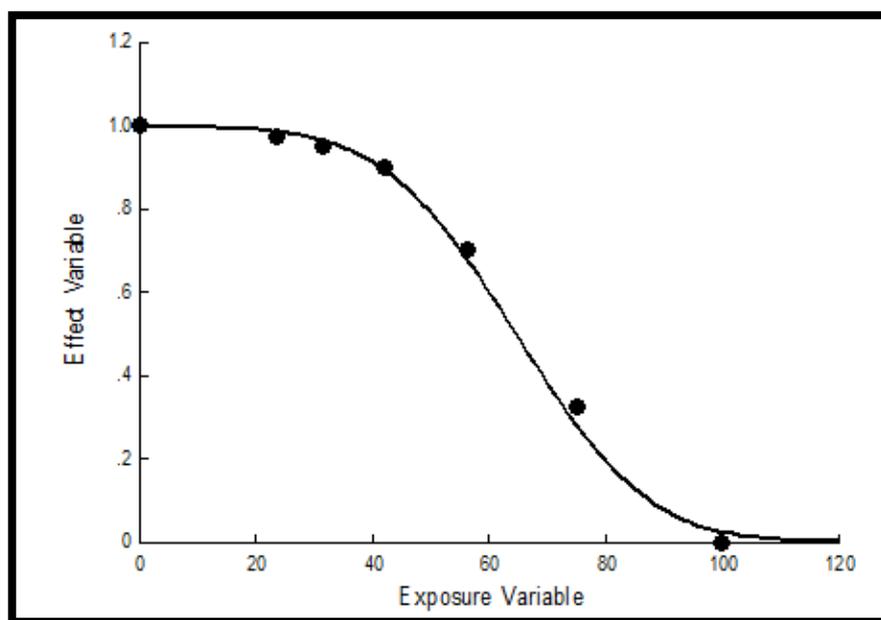


Figura 1. Toxicidad aguda de los lixiviados de las colillas de cigarro sobre la *Daphnia magna* después de 48 horas de exposición

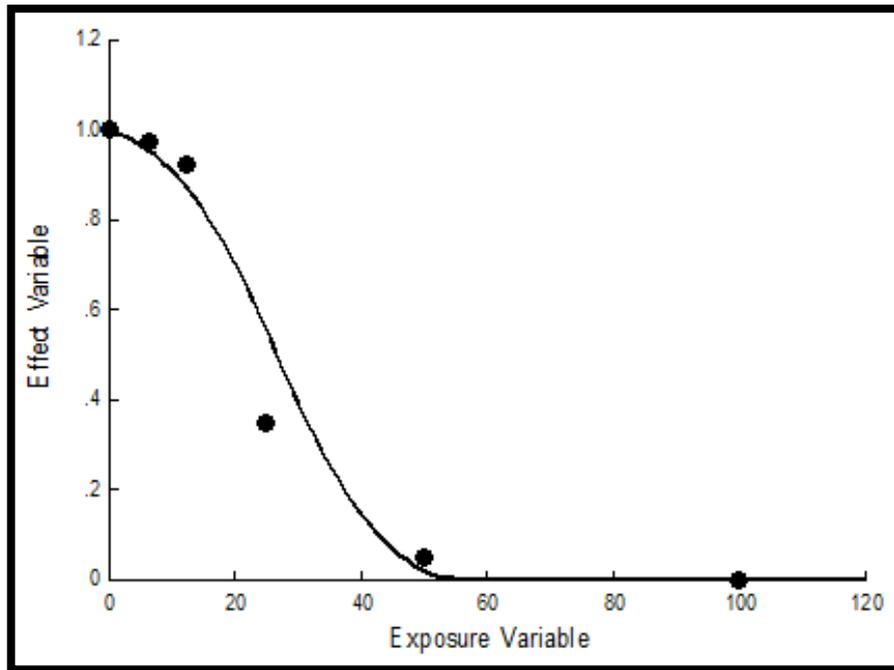


Figura 2. Toxicidad aguda de los lixiviados de las colillas de cigarro sobre la *Artemia franciscana* después de 24 h de exposición

Al comparar las CL_{50} , en colillas/L, de las colillas de cigarro obtenidas de diferentes estudios llevados a cabo hasta el momento, se puede apreciar que, en cuerpos de agua dulce, la *D. magna* del presente estudio es el organismo que presenta la menor sensibilidad a las colillas de cigarro (siendo hasta 7 veces menos sensible en un caso) y, con respecto a los cuerpos de agua marina, la *A. franciscana* del presente estudio también es el organismo que presenta la menor sensibilidad a las colillas de cigarro (siendo hasta 7 veces menos sensible en un caso) (Table 7).

Tabla 7. Potencial de toxicidad de los lixiviados de colillas de cigarro en otros organismos.

Especies	Autores	CL ₅₀ de Colillas de cigarro fumadas con tabaco remanente (colillas/L)
<i>Vibrio Fischeri</i> (Beijerinck 1889)	Micevska <i>et al</i> (2006)	0.582
<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	Dieng <i>et al.</i> (2013)	1 - 3
<i>Artemia franciscana</i> (Kellog, 1906)	Marco Liza	4.267
<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	Resgister (2000)	0.18
<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)	Marco Liza	1.294
<i>Ceriodaphnia cf. Dubia</i>	Micevska <i>et al</i> (2006)	0.04417
<i>Atherinops affinis</i> (Ayres, 1860)	Slaughter (2010)	1.1
<i>Pimephales promelas</i> (Rafinesque, 1820)	Slaughter (2010)	1.1
<i>Xenopus leavis</i> (Daudin, 1802)	Parker y Rayburn (2017)	1.14

Se observa una mayor resistencia de la *A. franciscana* al observarse una concentración letal media (CL₅₀) 3 veces superior que la concentración letal media (CL₅₀) de la población de *D. magna*. La concentración de nicotina y colillas de cigarro en la cual se empieza a ver efectos en la *A. franciscana* (LOEC) supera 3 veces la concentración que causa el 50% de las muertes en la población de *D. magna*. A la concentración de nicotina y colillas de cigarro en la cual se empiezan a observar muertes en la *D. magna* (LOEC) no supera la concentración más alta en la cual no se observan efectos en la *A. franciscana* (NOEC).

Tabla 8. Cantidad de masa y nicotina lixiviada de colillas de cigarro en la CL₅₀, NOEC y LOEC de *Artemia franciscana* y *Daphnia magna*.

<i>Masa de colillas de</i>	<i>Masa de tabaco</i>	<i>Masa de filtro sin tabaco</i>	<i>Nicotina total lixiviada (mg/L)</i>
----------------------------	-----------------------	----------------------------------	--

	<i>cigarro</i> (mg/L)	<i>remanente</i> (mg/L)	<i>remanente</i> (mg/L)	
<i>Ensayo de D. magna (CL₅₀)</i>	449.7	212.2	237.5	2.85
<i>Ensayo de D. magna (NOEC)</i>	293.16	138.33	154.83	1.86
<i>Ensayo de D. magna (LOEC)</i>	389.14	183.62	205.52	2.47
<i>Ensayo de A. franciscana (CL₅₀)</i>	1482.54	699.57	782.98	9.4
<i>Ensayo de A. franciscana (NOEC)</i>	694.9	327.9	367	4.40
<i>Ensayo de A. franciscana (LOEC)</i>	1389.81	655.81	734	8.81

5.3. Determinación del PNEC (Evaluación de la relación Concentración Efecto)

Para el bioensayo de *D. magna* y utilizando la CL₅₀ obtenida, se obtuvo un PNEC de 1.29×10^{-3} colillas/L ($0.45 \times \text{mg/L}$) y para la *A. franciscana* se obtuvo un PNEC de 4.27×10^{-3} colillas/L ($1.48 \times \text{mg/L}$). Respecto a la concentración de nicotina proveniente de la CL₅₀ de la *D. magna* y *A. franciscana*, el PNEC tendría un valor de $2.85 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$ y $9.40 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$, respectivamente.

Por otro lado, para el bioensayo de *D. magna* y utilizando el NOEC obtenido, se obtuvo un PNEC de 0.84×10^{-3} colillas/L ($0.3 \times \text{mg/L}$) y para la *A. franciscana* se obtuvo un PNEC de 2×10^{-3} colillas/L ($0.69 \times \text{mg/L}$). Respecto a la concentración

de nicotina proveniente del NOEC de la *D. magna* y *A. franciscana*, el PNEC tendría un valor de 1.86×10^{-3} mg/L y 4.4×10^{-3} mg/L, respectivamente.

Para poder realizar la tesis, el principal inconveniente que se encontró fue la escasa información a nivel nacional e internacional sobre ensayos biológicos, con organismos de cuerpos de agua de mar y cuerpos de agua dulce, que determinen los efectos agudos o crónicos de la exposición a los lixiviados de las colillas de cigarro y la metodología a seguir con las colillas de cigarro. Solo se encontró una fuente de información sobre la caracterización de residuos en las orillas de ríos y el mar, proveniente de la iniciativa “HAZla por tu playa”. No se encontró información sobre concentración de nicotina en cuerpos de agua, que si tienen otros países. Tampoco se encontró límites de la concentración de nicotina en cuerpos de agua ni en residuos.

VI. DISCUSION

La disminución del oxígeno disuelto en los ensayos no fue menor a los 6 ppm en el control ni en los tratamientos de la *D. magna* y *A. franciscana*, por lo que se cumple con la condición establecida en sus respectivos protocolos. De igual forma, la supervivencia en el control de ambos ensayos fue de 100%, por lo que los resultados obtenidos son válidos (Vanhaecke y Persoone, 1984; Iannacone y Maguiña, 2000; Castillo, 2004; Persoone *et al.*, 2009; Torres y Quintero, 2010; Iannacone *et al.*, 2016;)

La nicotina es una sustancia química antiherbívoro, derivado de la planta de tabaco y que tiende a liberarse en mayores cantidades en medios salinos por su

alta dureza (Slaughter, 2010). Tanto la *D. magna*, cuyo medio es el agua dulce, como la *A. franciscana*, cuyo medio es el agua marina, son en gran parte herbívoros y detritívoros por lo que su gran susceptibilidad a la nicotina proveniente de las colillas de cigarro debería ser similar en ambas especies o en todo caso mayor en la *A. franciscana* por estar en un medio salino; sin embargo, la sensibilidad de la *A. franciscana* es mucho menor que el de la *D. magna*. Según Pino y Lazo (2010), al comparar los ensayos biológicos de la *Daphnia* spp. y *A. franciscana*, la repetitividad y reproductividad de los ensayos son muy semejantes, pero en el test de la *A. franciscana* se evidencia una menor sensibilidad a los tóxicos. Pudiendo explicar, en parte, la diferencia de las sensibilidades entre los organismos del presente estudio.

Toxicidad de los lixiviados de la mezcla de colillas de cigarro en la *Artemia franciscana*

A diferencia de la *D. magna*, en el caso de la *A. franciscana*, no se han encontrado investigaciones con la misma especie en donde se determine el potencial de toxicidad de las colillas de cigarro, por lo que los resultados del presente estudio con esta especie no se podrán comparar directamente con otra especie de *Artemia*; Sin embargo, se comparará con otro estudio en donde se haya identificado el potencial de toxicidad de los lixiviados de las colillas de cigarro en la biota marina, como en *Atherinops affinis*. Al igual que en la *D. magna*, se consideró que los factores de diferencia de género y especie, pueden estar influyendo en la menor sensibilidad por parte de la *A. franciscana* (Warne *et al*, 2002; Micevska *et al*, 2006; Slaughter, 2011; Dieng *et al.*, 2013; Parker y Rayburn,

2017). Los cortes realizados a las colillas de cigarro simulan los daños que podrían sufrir las colillas de cigarro al ingresar al ambiente o a un relleno sanitario, liberando así mayor cantidad de contaminantes (Parker y Rayburn, 2017).

De todos los organismos en los que se han realizado bioensayos, entre ellos peces, se puede observar que la *A. franciscana* es el organismo menos sensible de todos. Al ser la *A. franciscana* un herbívoro y detritívoro, debería presentar una mayor sensibilidad al exponerlo a colillas de cigarro, a comparación de los peces (Slaughter, 2010); sin embargo, la *A. franciscana* en el presente estudio tiene una resistencia mucho mayor frente a las especies de peces de otros trabajos. Esto puede deberse a que los mismos tipos de cigarro utilizados para la *D. magna* fueron utilizados para la *A. franciscana* y el mentol que contienen las “capsulas de sabor” podrían estar inhibiendo la metabolización de la nicotina por parte de la *A. franciscana*, a pesar de ser un medio salino (Benowitz, Herrera y Jacob, 2004; Alsharari *et al*, 2015; Parker y Rayburn, 2017).

Por otro lado, esta menor sensibilidad, respecto a la mortalidad, por parte de la *D. magna* y *A. franciscana* al ser expuestas a los cigarrillos mentolados consumidos en Perú, no debería tomarse como un indicador que represente un menor daño a los ecosistemas acuáticos; ya que los efectos subletales, como teratogenicidad, malformación e inhibición de crecimiento, pueden presentarse a menor concentración en los cigarrillos mentolados que en los cigarrillos no mentolados (Parker y Rayburn, 2017).

Toxicidad de los lixiviados de la mezcla de colillas de cigarro en la *Daphnia magna*

Las diferencias entre nuestros resultados y la bibliografía citada, pueden sustentarse en que los autores trabajaron con especies diferentes del género *Daphnia* (*D magna* y *C. Cf. dubia*), organismos de género diferente (*Pimephales promelas*), o niveles tróficos distintos (Warne *et al*, 2002; Micevska *et al*, 2006; Slaughter, 2011; Dieng *et al.*, 2013; Parker y Rayburn, 2017); estas investigaciones fueron consideradas en el análisis, debido a la escasa información científica disponible sobre este tema.

Las causas de la toxicidad de las colillas de cigarro están relacionadas a la cantidad de partículas como el alquitrán en la solución, y a la cantidad de sustancias orgánicas polares y apolares presentes (Micevska *et al.*, 2006). La concentración del alquitrán presenta una relación directa con otras sustancias como la nicotina y el etilfenol principalmente (Micevska *et al.*, 2006), aunque se descartan como la causa de la diferencia significativa con nuestros resultados, ya que no se utilizaron filtros de plancton, como lo reportado por la mayor parte de los autores, debido a que se procuró generar un ambiente de condiciones similares a las encontradas en la realidad.

La concentración de la nicotina en las colillas de cigarro, principalmente en el tabaco, tiene una relación directamente proporcional con la respuesta de los organismos (Ko4720nar, 1977; Micevska *et al*, 2006) y podría estar influenciando en la menor sensibilidad de la *D. magna* frente a otros organismos; sin embargo, las marcas de cigarro utilizadas en el presente estudio no han variado de forma

significativa su contenido de nicotina y otras sustancias con gran participación en su toxicidad, por lo que es muy probable que hayan otras sustancias en los tratamientos del presente trabajo que estén inhibiendo los tóxicos, dando así, la impresión de una menor sensibilidad por parte de la *D. magna* (Kozlowski *et al.*, 1998; Loureiro *et al.*, 2011; Green *et al.*, 2014; Parker y Rayburn, 2017).

La aparente menor sensibilidad por parte de la *D. magna* frente a los otros organismos de agua dulce de otros estudios, se puede deber a que los cigarrillos utilizados en el presente estudio contenían “capsulas de sabor” que fueron introducidos a Estados Unidos en el 2008 y en México en el 2011, por lo que se estima que llegaron al Perú durante esos años (Trasher *et al.*, 2015). Estas capsulas, según Trasher *et al.* (2015), contienen mentol con otros saborizantes de uso frecuente en la industria del tabaco, como lo son los azúcares, acetaldehído, ácido levulínico, clavo, entre otros. El mentol inhibe de forma significativa el metabolismo de la nicotina por parte de la isoenzima CYP2A6 y, al menos en las ratas y los humanos, esto evitaría la generación de Cotinina, sustancia a la cual se le podría atribuir la inducción a la adicción y demás efectos del consumo de cigarrillo (Benowitz, Herrera y Jacob, 2004; Alsharari *et al.*, 2015). Así como en las ratas y en los humanos el mentol, que contienen las “capsulas de sabor”, podría estar interfiriendo en las vías de metabolización de la nicotina en la *D. magna*, reduciendo de esta manera los efectos tóxicos. Resultados similares se pudo evidenciar en el trabajo de Parker y Rayburn (2017), en donde se concluye que las colillas de cigarrillo no mentoladas tenían un mayor potencial de toxicidad que los cigarrillos mentolados; esto después de evidenciar que el *X. Leavis* empezaba a mostrar sensibilidad por las colillas de cigarrillo no mentoladas en concentraciones 3 veces menores de los que se evidenciaban en los cigarrillos

mentolados. Para el caso del etilfenol y los metales, no se ha encontrado suficiente evidencia que pueda indicar la inhibición del etilfenol o la formación de quelantes con los metales, a causa del mentol y/u otras sustancias provenientes de las “capsulas de sabor”.

Evaluación del Riesgo Ambiental de las colillas de cigarro consumidas en Perú

Para evaluar la exposición de las colillas de cigarro en agua dulce (PEC), se utilizó las observaciones y mediciones que se realizaron en campo por parte de distintos investigadores alrededor del mundo. Solo se encontró un estudio cuyas mediciones se hicieron utilizando la cantidad de colillas de cigarro como unidades de medida de concentración en agua. Según Montalvao et al (2019), La concentración real de colillas de cigarro en cuerpos de agua dulce cercanos a Urutaí, Brasil, podría aproximarse a 0.023 colillas/L y en el peor de los casos 0.23 colillas/L. Al caracterizar el riesgo (PEC/PNEC), se encontró una relación de 17.7743, lo que significaría que las colillas de cigarro evaluadas en el presente estudio, podrían generar daño en el ambiente en Urutí, Brasil (UNEP y ICPS, 1999).

Por otro lado, en los demás estudios no se utilizó la cantidad de colillas de cigarro como parámetro de medición, sino la concentración de nicotina en los cuerpos de agua. Para determinar el PEC en agua dulce, respecto a nicotina, se utilizaron las mediciones que se realizaron en campo por parte de distintos investigadores alrededor del mundo. En Madrid, España se encontraron concentraciones de $1.9 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ (Valcárcel et al., 2011); en agua subterránea de reino unido se

encontró concentraciones de $8.1 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ (Stuart *et al.*, 2011); en aguas superficiales de Estados Unidos se encontraron concentraciones desde $2.5 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ hasta $6 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ (Benotti y Brownawell, 2007); en agua potable de 30 ciudades con concentraciones en promedio de $1.9 \times 10^{-5} \text{ mg/L}$ (Boleda *et al.*, 2011); en Miami también se encontraron concentraciones cercanas a $3 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$ (National Research Council, 1977) y en Alemania se estimó la concentración de nicotina en las escorrentías de agua dulce cercanas a 0.62 mg/L (Green *et al.*, 2014).

Al caracterizar el riesgo (PEC/PNEC) con el PNEC obtenido de la CL50, se encontraron que las colillas de cigarro consumidas en Perú no generarían daño a los ecosistemas de agua dulce en todas las regiones en donde se han hecho mediciones de nicotina, a excepción de Reino Unido, Miami y Alemania, en donde se determinó relaciones de 2.93, 1.05 y 217, respectivamente; lo que significaría que las colillas de cigarro consumidas en Perú podrían generar daño a la aptitud de los organismos vivos y la dinámica de las poblaciones que componen el ecosistema acuático (Montalva *et al.*, 2019). Por otro lado, si caracterizamos el riesgo con el PNEC obtenido del NOEC, se encontraría que las colillas de cigarro consumidas en Perú generarían daño a los ecosistemas de agua dulce en todas las regiones en donde se han hecho mediciones de nicotina.

No se pudo encontrar mediciones de nicotina en cuerpos de agua marina, por lo que no se pudo comparar el PNEC establecido para estos cuerpos de agua con mediciones en otras regiones. Esto puede deberse a que estos tipos de residuos son estudiados principalmente en cuerpos de agua dulce y pocos en ambientes marinos (Araujo, 2019)

Legislación de productos que contengan nicotina.

En el actual reglamento de la Ley de Gestión Integral de Residuos sólidos, y a pesar de existir industrias relacionadas a productos de tabaco en el norte del Perú (MINSA, 2001), no se contempla residuos que puedan contener concentraciones de nicotina. Sin embargo, según Green *et al.* (2014), en la Unión Europea y en Estados Unidos se consideran como peligrosos a los residuos que puedan contener nicotina por su potencial de toxicidad para los organismos acuáticos. En Estados Unidos se hace una exclusión de los cigarrillos electrónicos, parches con nicotina y cualquier otro producto que se vaya a comercializar por parte de la industria del tabaco, hasta poder tener suficiente información toxicológica que sustente su inclusión (EPA, 2019). Por otro lado, la unión europea es menos exigente e incluye a todos los residuos que contengan nicotina por encima 0.5 mg/g como peligrosos (Abdul y Amira, 2015; Green *et al.*, 2015; Rebischung *et al.*; 2018). Considerando los datos que brindaron Kozlowski *et al.* (1998) y Wright *et al.* (2015), una de las colillas de cigarro que se utilizó en el presente estudio, con 1 cm de tabaco remanente, contendría, en promedio, más de 7.012 mg/g de nicotina, por lo que se consideraría como residuo peligroso en territorio europeo. Este resultado concuerda con la conclusión de Rebischung *et al.* (2018), al considerar que las colillas de cigarro deben ser clasificados como residuos peligrosos, principalmente por su contenido de nicotina y los resultados obtenidos hasta el momento en ensayos de toxicidad aguda.

VII. CONCLUSIONES

- El potencial de toxicidad de los lixiviados de la mezcla de las colillas de cigarro, de las cuatro marcas más consumidas en el Perú, para causar la muerte del 50% de la población de *D. magna* en un tiempo de exposición de 48h es de 1.29 ± 0.09 colillas/L (449.7 ± 31.9 mg/L)
- El potencial de toxicidad de los lixiviados de la mezcla de las colillas de cigarro, de las cuatro marcas más consumidas en el Perú, para causar la muerte del 50% de la población de *A. franciscana* en un tiempo de exposición de 24h es de 4.27 ± 0.53 colillas/L (1482.54 ± 185.28 mg/L)
- El experimento realizado con ambos organismos revela que los químicos en las colillas de cigarro pueden ser tóxicos para organismos que ocupan un lugar crítico en comunidades acuáticas, como la *D. magna* y la *A. franciscana*, al estar presentes y sobrepasar la concentración de 1.29×10^{-3} colillas/L (0.45 mg/L), en cuerpos de agua dulce, y 4.27×10^{-3} colillas/L (1.48 mg/L), en cuerpos de agua marina. También se estimó la nicotina lixiviada de las colillas de cigarro y se determinó que si su concentración sobrepasa los valores de 2.85×10^{-3} mg/L, en cuerpos de agua dulce, y 9.40×10^{-3} mg/L, en cuerpos de agua marina, puede ser tóxico para los organismos que habitan dichos ambientes.

VIII. RECOMENDACIONES

- Para realizar ensayos biológicos, utilizar el peso de las colillas en vez de usar la cantidad de unidades. Esto debido a que, en el caso de las colillas de cigarro, se podrá relacionar la cantidad de nicotina, u otra sustancia que lixivie, encontrada en los ambientes acuáticos con la cantidad de colillas en ese medio.
- Utilizar el presente estudio como una de las bases para establecer límites en la concentración de nicotina en los residuos sólidos o en los cuerpos de agua.
- Se recomienda realizar más estudios que, junto con la información del presente trabajo, permitan tener suficiente información toxicológica que sustente su inclusión o exclusión de los residuos “Peligrosos” y permanezca o no en la clasificación “Residuos Sólidos No Aprovechables”, según la Norma Técnica Peruana del código de Colores para el almacenamiento de residuos sólidos, NTP 900.058.2019.
- Utilizar la información del presente estudio como material para políticas de concientización y el fomento de nuevas alternativas de reducción, segregación, valorización y disposición de estos residuos.
- Utilizar el cambio de comportamiento, u otro biomarcador, como parámetro a evaluar que indique el fin de los ensayos con los lixiviados de las colillas de cigarro. De esta forma se podría determinar la magnitud de los riesgos eco-toxicológicos más próximos a la realidad. Estos cambios de comportamiento serían inducidos por las sustancias que contienen los lixiviados de las colillas de cigarro.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul, A., Amira, N. (2015). Cigarette Butts Pollution and Environmental Impact - A Review. *Applied Mechanics & Materials*, 773-774: 1106-1110.
- Abdul, A., Mohajerani, A. (2011). Possible Utilization of Cigarette Butts in Light-Weight Fired Clay Bricks. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2(3): 118-122.
- Albrecht, A.; Kandji, (S. 2003). Carbon sequestration in tropical agro-forestry systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 99(1-3): 15-27.
- Alsharariñ, S., King, J., Nordman, J., Muldoom, P., Jackson, A., Zhu, A., Tyndale, R., Kabbani, N., Damaj, M. (2015). Effects of Menthol on Nicotine Pharmacokinetic, Pharmacology and Dependence in Mice. *Plos One* 10(9): 1-16.
- Araujo, M., Costa, M. (2019). A critical review of the issue of cigartte butt pollution in coastal. *Environmental Research*. 172: 172-149.
- Argota, G., Iannacone, J. Fimia, R. (2013). Características de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) para su selección como biomonitor en Ecotoxicología Acuática en Cuba. *The Biologist (Lima)*, 11(2): 229-236.
- Ashall, F., Tefera, T. (2016). *Investigation of toxicity of Cigarette Butts Collected in Addis Ababa to Swiss Albino Mice* (Tesis de Maestria). Addis Adaba University, Ethiopia.
- Asociación de Profesionales de Playas y Medio Ambiente. *Informe Sobre los*

Filtros de Cigarrillos. Recuperado de:
http://www.apyma.com/images/Informes/Informe_colillas.pdf

Asociación Española de Toxicología. (1995). *Glosario de Términos Toxicológicos IUPAC* (Duffus y Cols. 1993). España.

Bananomi, G., Incerti, G., Cesarano, G., Gaglione, S., Lanzotti, V. (2015). Cigarette butt decomposition and associated chemical changes assessed by ¹³C CPMAS NMR .*PLoS One.*, 10(1): 1-16.

Banco Mundial. (2012). *What a Waste, A Global Review of Solid Waste Management.* Recuperado de:
[DEVELOPMENT/0,,contentMDK:23172887~pagePK:210058~piPK:210062~theSitePK:337178,00.html](http://www.bancomundial.org/es/contentMDK:23172887~pagePK:210058~piPK:210062~theSitePK:337178,00.html).

Barcat, J. (2009). *Bestiario Biomédico y el principio de Krogh.* *Medicina* (Buenos aires), 69(5): 576-581.

Benotti, M., Brownawell, B. (2007). Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environmental Science and Technology.* 41: 5795–5802.

Benowitz, N., Herrera, B., Jacob, P. (2004). Mentholated Cigarette Smoking Inhibits Nicotine Metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 310 (3): 1208-1215.

Bertoletti, E., Zagatt P. (2008). *Ecotoxicología Acuática: princípios e aplicações.* Sao Carlos, Brasil: Editora Rima.

Boleda, M., Huerta-Fontela, M., Ventura, F., Galceran, M. (2011). Evaluation of

- the presence of drugs of abuse in tap waters. *Chemosphere* 84: 1601–1607.
- Booth, D., Gribben, P., Parkinson, K. (2015). Impact of cigarette butt leachate on tidepool snails. *Marine Pollution Bulletin*. 95 (1): 362-364.
- Capó, M. (2007). Principios de Ecotoxicología. Madrid, España: *Editorial Tebar Flores*.
- Carballo, O., Arencibia-Carballo, G., Isla, M., Gonzales, C., Gonzales, T., Mantilla, N. (2003). Bioensayo de toxicidad con *Artemia Franciscana* (Crustacea-Branchiopoda) en extractos de sedimento superficial del Golfo de Guacanayabo, Cuba. *Revista de toxicología en línea*. 38: 32-50
- Castillo, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*.
- Cisneros, R. (2002). *Producción semi-Intensiva de biomasa de Artemia franciscana Kellogg 1906 (cepa Virrilá, Perú) utilizando diferentes dietas* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Cisneros, R., Vinetea, E. (2009). Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellogg 1906 utilizando diferentes dietas. *Ecología Aplicada*, 8(1): 9-14
- Corena, M. (2008). *Sistema de tratamientos para lixiviados generados en rellenos sanitarios* (Tesis de título). Universidad de Sucre, Colombia.
- D'Henri, M., Duarte, M., Raposo, L., Camargo, J., Hofmann, T., Ziani, P. (2017). Process development for cigarette cutts recycling into cellulose pulp.

Waste Management. 60: 140–150.

Dieng, A., Rajasaigar, S., Hassan, A., Ahmad, H., Salmah C., Fatma, W., Satho, T., Miake, F., Fukumitsu, Y., Ramli, A. (2013). Turning cigarette butt waste into an alternative control tool against an insecticide-resistant mosquito vector. *Acta Tropica*. 128(3), 584-590.

Ebert, D. (2005). Introduction to Daphnia Biology. En D, Ebert. Epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia (pp. 70-94). Switzerland

Environmental Protection Agency (EPA). (2019). Management standards for hazardous waste pharmaceuticals and amendment to the P075 listing for nicotine. *Federal Register*. Recuperado de <https://www.federalregister.gov/documents/2019/02/22/2019-01298/management-standards-for-hazardous-waste-pharmaceuticals-and-amendment-to-the-p075-listing-for>

Environmental Protection Agency (EPA). (2016). The toxicity relationship analysis program (TRAP). *Environmental Protection Agency*. Recuperado de https://archive.epa.gov/med/med_archive_03/web/html/trap.html

Eriksen, M., Mackay, J., Schluger N., Islami, F., Drope, J. (2015). The tobacco atlas. Atlanta: American Cancer Society. *Tobacco Control*.

Euromonitor International. (2017). *Cigarettes in Peru*. Passport. 6-7.

Gagne, F. (2014). *Biochemical Ecotoxicology*. Canada: Elsevier.

Garcés, F., Forcelini, C. (2011). Peso de hojas como herramienta para estimar el área foliar en soya. *Ciencia y Tecnología*, 4(1): 13-18.

- Garcia, H., Toyo, L., Acosta, Y., Rodriguez, L., El Zauahre, M. (2014). Percepción del manejo de residuos solidos urbanos (Fraccion Inorganica) En Una Comunidad Universitaria. *Multiciencias*, 14(3): 247-256.
- Granda, J., Giron, W., Lopez, L. (2016). Cigarette Butts: The collateral effects of cigarettes on humans, animals and the environment. *Arch Bronconeumol*, 52(5): 285.
- Green, A., Putschew, A., Nehls, T. (2014). Littered cigarettes butts as a source of nicotine in urban waters. *Journal of Hidrology*. 519: 3466-3474.
- Halling-Sørensen, B., Holten Lützhøft, H-C., Andersen, H. R., & Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: Comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(S1): 53-58.
- Hammer, Harper, D., Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9.
- Hickey, G. (2010). *Ecotoxicological Risk Assessment: Developments in PNEC estimation* (Tesis doctoral). University of Durham. Inglaterra.
- Iannacone, J., alvariño, L. (2009). Aquatic risk assessment of seven pharmaceutical products on *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*, 8(1-2): 71-80.
- Iannacone, J., Alvariño, L., Valle, V., Ymaña. B., Argota, G., Fimia. F., Carhuapoma, M., Castañeda L. (2016). Toxicidad de agentes

antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camaron salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). *Revista de Toxicologia*, 33: 31-38.

Iannacone, J., Argota, G., Fimia, R. (2013). Características de *Gambusia punctate* (Poeciliidae) para su selección como biomonitor. *The Biologist*, 11(2): 229-236.

Iannacone, J., Maguiña, A. (2000). *Artemia franciscana* Kellog 1906 “Camaron salino” como agente de bioensayo para evaluar cinco extractos crudos de plantas con propiedades antiparasitarias. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*, 66(3): 154-169.

Ize, I., Zuk, M., Rojas, L. (2010). *Introducción al análisis de riesgos ambientales*. Mexico: Universidad Nacional de Mexico.

Konar, S. (1977). Toxicity of nicotine to aquatic life. *Indian Journal of Fisheries*, 24: 124- 128.

Kozlowski, L., Mehta, N., Sweeney, C. (1998). Filter Ventilation and nicotine content of tobacco in cigarettes from Canada, The United Kingdom and United States. *Tobacco Control*. 7:369-375.

Lavens, P., Sorgeloos, P. (1996). *Manual of Production and Use of live food for aquaculture*. Roma, Italia:FAO Fisheries Technical Paper 361.

Life Out Of Plastic, Conservemos por Naturaleza, Ministerio del Ambiente. (2017). *Del Perú para el mundo: HAZla por tu playa*.

Loureiro, C.; Castro, B., Pereira, J. (2011). Performance of standard media in

toxicological assessments with *Daphnia magna*: chelators and ionic composition versus metal toxicity. *Ecotoxicology* 20(1): 139-148.

Micevska, T., Warne, M.S.J., Pablo, F., Patra, R. (2006). Variation in, and causes of, toxicity of cigarette butts to a Cladoceran and Microtox. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 205.

Ministerio de Agricultura. (2009). *Resultados y lecciones en producción del crustaceo Artemia en salinas (95)*. Recuperado de: https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75615_archivo_01.pdf.

Ministerio de Salud (2001). *Plan nacional para la prevención y control del tabaquismo en el Perú 2001-2005*. Perú: PERUGRAF impresiones.

Ministerio del Ambiente. (2016). *VI Informe anual de residuos sólidos municipales y no Municipales 2013*. Recuperado de: <http://redrrss.minam.gob.pe/material/20160328155703.pdf>.

Moerman, J., Potts G. (2011). Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tobacco Control*, 20: 30-35.

Montalvao, M., Quintao, T., Da silva, T., Mesak, C., Pereira, A., Rodriguez, A., De Andrade, J., Lopes, T., Malafaia, G. (2019). Cigarette butt leachate as a risk factor to the health of freshwater bivalve. *Chemosphere*, 234: 379 – 387.

Monzonis, J. (2011). *Estudio para la minimización del residuo de colillas de tabaco y su posible reutilización* (Trabajo Final de Carrera). Universidad Politecnica de Valencia, España.

National Research Council, (1977). *Drinking water and health*. Washington D.C: National Academies Press.

Novonty, T., Lum, K., Smith, E., Wang, V., Barnes, R. (2009). Cigarettes butts and the case for an environmental policy on hazardous cigarette waste. *International Journal Environmental Research and Public Health*, 6(5): 1691-1705

Novotny, T., Zhao F. (1999). Consumption and production waste: Another externality of tobacco use. *Tobacco Control*, 8: 75-80.

Núñez, M., Hurtado, J. (2005). Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna straus* (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. *Revista Peruana de Biología*, 12(1): 165-170.

Organizacion Mundial de la Salud. (2006). *Tabaco mortífero en todas sus formas*. Recuperado de:
http://www.who.int/tobacco/resources/publications/wntd/2006/translations/Brochure_Spanish.pdf.

Parker, T., Rayburn, J. (2017). A comparison of electronic and traditional cigarette butt leachate on the development of *Xenopus laevis* embryos. *Toxicology Reports*. 4: 77-82.

Perez, A., Batista, M., Velasquez, J., García, J. (2014). *Acetato de celulosa del bagazo de la caña de azúcar: Plastificación y evaluación de propiedades* (Tesis de título). Universidad de Holguin Oscar Lucero Moya, Cuba.

Persoone, G., Bauso, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K., Moreira Santos,

- M., Vollat, B., Torokne, A., Han, T. (2009). Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – evaluation of the sensivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 393(1): 1-29.
- Pino, O., Lazo, J. (2010). Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para eco-toxicólogos y químicos de productos naturales. *Protección Vegetal*. 25(1): 34 - 43.
- Planes, E., Fuchs, J. (2015). Cuáles son los aportes de la ecotoxicología a las Regulaciones ambientales. *Ciencia e Investigación*. 65 (2): 46-60.
- Rebischung F., Chabot, L., Biaudet, H., Pandard, P. (2018). Cigarette butts: A small but hazardous waste, according to European regulations. *Waste Management*. 82: 9-14
- Register, K. (2000). Cigarette butts as litter—Toxic as well as ugly. *Bulletin of American Littoral Society*. 25(2): 23 – 30.
- Richard L Barnes. (2011). Regulating the disposal of cigarettes as toxic hazardous waste. *Tabacco Control*. 20 (suppl 1): 45 – 48.
- Slaughter, E. (2010). Toxicity of cigarette butts and their chemical components to the marine and freshwater fishes, *Atherinops affinis* and *Pimephales promelas* (tesis de Maestría). San Diego State University, United States.
- ASTM International. (2004). *Standar guide for acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates and amphibians*. Recuperado

de: https://poseidonsciences.com/ASTM_E_729.pdf

Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., Hart, A. (2011). Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Science of the Total Environment*. 416: 1 - 21.

The international Programme on Chemical Safety y The United Nations and Environment Programme. (1999). *Chemical risk assessment*. Recuperado de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66398/WHO_PCS_99.2_eng.pdf;jsessionid=C8B5F4592F9E65C46DF9EE70831D9A9F?sequence=1

Torres, S., Quintero, V. (2009). *Determinación de la concentración letal media (CL5048) De Aluminio y Arsénico mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia magna* (tesis de Grado). Universidad de Salle, Colombia.

Trasher, J., Abad/Vivero, E., Moodie, C., O' Connor, R., Hammond, D., Commings, K., Yong, H., Solloum, R., Czoli, C., Reynales - Shigemats, L. (2015). Cigarettes brands with flavour in the filter; trends in use and brand perception among smokers in the USA, Mexico and Australia, 2012 - 2014. *Tobacco Control*, 25: 275-283.

United States Department of Agriculture (USDA). (2000). *Tobacco situation and outlook report*. TBS-246- Wshington DC: U.S. Department of Agriculture.

US Environmental Protection Agency (EPA). (2018). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. United States: US EPA.

- US Environmental Protection Agency (EPA). (1991). *Methods for aquatic toxicity identification and evaluations: Phase 1 toxicity characterisation procedures*. United States: US EPA.
- US Environmental Protection Agency (EPA). (1993a). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4- 90/027F*. United States: US EPA.
- US Environmental Protection Agency (EPA). (1993b). *Methods for aquatic toxicity identification and evaluation: Phase 2 toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity*. United States: US EPA.
- US EPA. (1993c). *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase 3 toxicity confirmation procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity*. United States: US EPA.
- Valcárcel, Y., Alonso, S., Rodríguez-Gil, J., Gil, A., Catala, M. (2011). Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*. 84: 1336–1348.
- Vanhaecke, P., Persoone, G. (1984). The Arc-Test: A standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. *Ecotoxicology testing for the marine environment*. 2: 143-157.
- Warne, M., Patra, R., Cole, B., & Lunau, B. (2002). Toxicity and a hazard assessment of cigarette butts to aquatic organisms. *Interact 2002 - Programme and Abstract Book*. Conferencia llevada a cabo en Sydney,

Australia.

Wright, S.L., Rowe, D., Reid, M.J., Thomas, K.V., Galloway, T.S., 2015.

Bioaccumulation and biological effects of cigarette litter in marine worms.

Scientific Reports, 5: 1 – 10.

Kurmus, H., Mohajerani. (2020). The toxicity and valorization options of cigarettes

butts. *Waste management*. 104: 104 – 118.

Joly, F., Coulis, M. (2018). Comparison of cellulose vs. plastic cigarette filter

decomposition under distinct disposal environments. *Waste Management*.

72: 349 – 353.

X. ABREVIATURAS

CL₅₀: Concentración letal media.

CB's: Colillas de cigarro, por su abreviatura en inglés (Cigarettes butts).

mL: milésima parte de un (01) litro.

mg: milésima parte de un (01) gramo.

NOEC: Concentración máxima en la que no se observan efectos (por sus siglas en ingles).

LOEC: Concentración mínima en la que se observan efectos (por sus siglas en ingles).

XI. Anexo 1

Tabla 9. Prueba de Kruskal Wallis para la *Daphnia magna*

H (chi2): 19.52
Hc (tie corrected): 21.16
p (same): 0.0007546
Existe, al menos, una diferencia significativa entre los tratamientos

Tabla 10. Prueba de U de Mann Whitney para la *Daphnia magna*

	0%	23.68%	31.64%	42.19%	56.25%	75%	100%
0%		0.4533	0.4533	0.1859	0.03007	0.02021	0.01312
23.68%	0.4533		1	0.505	0.04159	0.02558	0.01771
31.64%	0.4533	1		0.6198	0.08571	0.02558	0.01771
42.19%	0.1859	0.505	0.6198		0.2076	0.02843	0.02021
56.25%	0.03007	0.04159	0.08571	0.2076		0.0692	0.03007
75%	0.02021	0.02558	0.02558	0.02843	0.0692		0.02021
100%	0.01312	0.01771	0.01771	0.02021	0.03007	0.02021	

XII. Anexo 2

Tabla 11. Prueba de Kruskal Wallis para la *Artemia Franciscana*

H (chi2): 19.52
Hc (tie corrected): 21.16
p (same): 0.0007546
Existe, al menos, una diferencia significativa entre los tratamientos

Tabla 12. Prueba U de Mann Whitney para la *Artemia franciscana*

	0%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%
0%		0.4533	0.1859	0.02107	0.01771	0.01312
6.25%	0.4533		0.505	0.02652	0.02284	0.01771
12.5%	0.1859	0.505		0.0294	0.02558	0.02021
25%	0.02107	0.02652	0.0294		0.03719	0.02107
50%	0.01771	0.02284	0.02558	0.03719		0.4533
100%	0.01312	0.01771	0.02021	0.02107	0.4533	

XIII. Anexo 3

Tabla 13. Concentraciones de nutrientes del F/2 Algae FOOD Part A y B

<i>F/2 Algae Food Part A</i>	<i>F/2 Algae Food Part A</i>
Fe = 0.82 %	N = 9.33 %
Mn = 0.034 %	P205 = 2.0 %
Co = 0.002 %	Vitamina B1 = 0.07%
Zn = 0.0037 %	Vitamina B12 = 0.0002 %
Cu = 0.0017 %	Biotina = 0.0002 %
Mo = 0.0009 %	-

XIV. Anexo 4

Tabla 14. Parámetros del modelo de distribución de los resultados de la *Daphnia magna*

	<i>Estimación Inicial</i>	<i>Estimación final</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite inferior (95%)</i>	<i>Límite superior (95%)</i>
<i>CL50</i>	65.590	64.721	2.307	60.120	69.323
<i>Desv. Estándar</i>	16.65	17.917	2.0975	14.588	23.288
<i>Y0</i>	0.9750	0.9965	0.0088188	0.91119	1

Tabla 15. Parámetros del modelo de distribución de los resultados de la *Artemia franciscana*

	<i>Estimación Inicial</i>	<i>Estimación final</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Límite inferior (95%)</i>	<i>Límite superior (95%)</i>
<i>CL50</i>	36.638	26.668	1.6605	23.34	30.001
<i>Desv. Estándar</i>	22.729	11.87	1.3303	9.7416	15.198
<i>Y0</i>	0.9875	0.9999	0.015418	0.69134	1

XV. Anexo 5

Registro fotográfico

Figura 3. Tratamientos con lixiviados de colillas de cigarro en *Daphnia magna*



Figura 4. Tratamientos con lixiviados de colillas de cigarro en *Artemia franciscana*

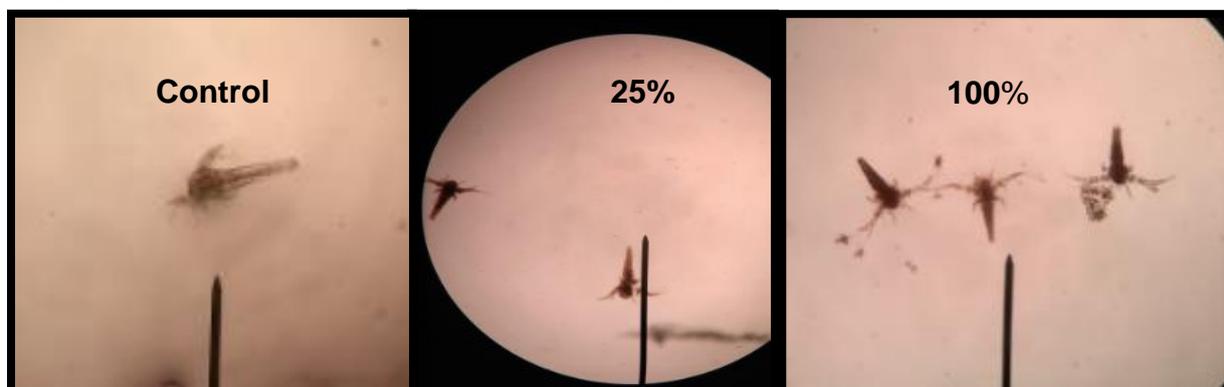


Figura 5. Cultivo de *Chlorella* sp. y nutrientes utilizados.



Figura 6. Recipientes de cultivo de *Daphnia magna*.



Figura 7. Cultivo de la *Daphnia magna*



Figura 8. Corte, pesaje y realización de lixiviados de colillas de cigarro



Figura 9. Procedimiento de eclosión de *Artemia franciscana*

