AFLORAMIENTO DE *AZOLLA SP.* PRESENTE EN EL HUMEDAL CARABALO (VALLE DEL CAUCA) COLOMBIA: METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE TOXICIDAD

MARY LILIÁN CARABALI ISAJAR

CÓDIGO 1062286399

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

POSGRADO INTERFACULTADES EN MICROBIOLOGÍA

BOGOTÁ 2014

AFLORAMIENTO DE *AZOLLA SP.*PRESENTE EN EL HUMEDAL CARABALO (VALLE DEL CAUCA) COLOMBIA: METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE TOXICIDAD

MARY LILIÁN CARABALI ISAJAR

DIRECTORA DE TESIS:

Q.F.B. MSc. MARÍA TERESA JESÜS REGUERO REZA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
POSGRADO INTERFACULTADES EN MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ, 2014

DEDICATORIA

Al único y sabio Dios sea honor y gloria mediante Jesucristo por los siglos de los siglos Amén. 1Tim 1-17.

Los muchachos se fatigan y se cansan, los jóvenes flaquean y caen, pero los que esperan en Jehová tendrán nuevas fuerzas; levantarán alas como las águilas, correrán y no se cansarán, caminarán y no se fatigarán. Isa 40: 30-31.

Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora. Ecl.3-1.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi Señor el Dios Altísimo, por la vida de mis autoridades y la mía, por haberme escogido, por su misericordia, gracia y amor. A mis padres Mary Luz y Alejandro, quienes se dedicaron a darme buena enseñanza, a adquirir sabiduría e inteligencia, a no andar por malos caminos, además de todos sus esfuerzos a lo largo de mi carrera. A mis hermanos: Carolina, Eliana y Alejandro, por su apoyo, consejos y dedicación. A Anyela, Martha, Tania y demás familiares por su paciencia y favor.

Al alma mater, la Universidad Nacional de Colombia por forjarme como magister, a la profesora María Teresa Jesús Reguero Reza, del Instituto de Biotecnología por depositar su confianza en mí y brindarme su importantísima ayuda y guía en la realización del proyecto.

A la magíster en Microbiología Keile Yesenia Brugés Pineda, por toda su guía, apoyo y su amistad.

A los profesores Javier Rincón Velandia, Maritza Rojas Cardozo del Departamento de Farmacia, por el apoyo y la guía.

A la estudiante de maestria en Farmacia Lady Angulo y al estudiante de doctorado en Farmacia Jorge Hernandez por su apoyo y valiosos aportes a este proyecto.

Agradezco al Instituto de Biotecnología por brindarme el espacio para realizar mis investigaciones. Quiero agradecer sustancialmente a Socorro Prieto, Asistente del Posgrado Interfacultades en Microbiología. A los integrantes de la coordinación de laboratorio, reconociendo de manera especial a María Alejandra, Yuly, por su apoyo y comprensión durante estos dos años. A los estudiantes Edith Margarita Quiñonez, Calvache, Mayra Alejandra López Zubieta, Juan Manuel Arias Pinilla, por el apoyo logístico y humano en el desarrollo de la investigación. Y a todas las personas que de una u otra manera me han ayudado a en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN……..…..1

2. MARCO
TEÓRICO…….....3

2.1. HUMEDAL CARABALO O AVISPAL…….....3

2.1.1. EL HUMEDAL CARABALO Y *Azolla sp*……..7

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN DELGÉNERO *Azolla*……...7
2.3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD……...13

2.3.1. ORGANISMOS DE PRUEBA……13

2.3.1.1. *Daphnia magna*……..13

2.3.1.2. *Hydra attenuata*……...15

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN……...…16

4. JUSTIFICACIÓN…….....16

5. OBJETIVOS……..18

5.1. OBJETIVO GENERAL……18

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS……..…18

6. METODOLOGÍA……..19

6.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL
VEGETAL……....19

6.2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE MUESTRAS DE AGUA……..20

6.3. EL AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN *Azolla sp*……..…21

6.4. BIOENSAYOS CON *Daphnia magna*……...23

6.4.1. CULTIVO DE *Daphnia magna*……23

6.4.2. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD……..……24

6.4.3. ENSAYOS TOXICIDAD AGUA HUMEDAL CARABALO……..…27

6.4.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS EXTRACTOS DE *Azolla sp*……...27

6.5. BIOENSAYOS CON *Hydra attenuata*……....29

6.5.1. CULTIVO DE *Hydra attenuata*……..……...29

6.5.2. ENSAYOS DE REPRODUCCIÓN *Hydra attenuata*……...*29*

6.5.3. ENSAYOS DESENSIBILIDAD……31

6.5.4. ENSAYOS TOXICIDAD AGUA HUMEDAL *CARABALO*…….....33

6.5.5. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS EXTRACTOS DE *Azolla sp*. ……..33

6.6. FRACCIONAMIENTO, AISLAMIENTO BIOGUIADO……... ...35

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..36

7.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL……..36

7.2. SECADO DEL MATERIAL VEGETAL……..37

7.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE DE *Azolla* DEL HUMEDAL *CARABALO* …….....38

7.4. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE MUESTRAS DE AGUA HUMEDAL *CARABALO* …….....39

7.4.1. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y CALIDAD DE AGUA.. ……..39

7.4.2. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y *Azolla* aff. *filiculoides* Lam……45

7.4.3. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y SU VARIACIÓN DE ACUERDO CON LA NUEVA DINÁMICA DEL HUMEDAL……47

7.5. AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN *Azolla* aff. *filiculoides* Lam……49

7.6. ENSAYOS TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna* COMO ORGANISMO DE PRUEBA……57

7.6.1. ENSAYOS TOXICIDAD AGUA HUMEDAL *CARABALO*……..57

7.6.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam……58

7.7 ENSAYOS TOXICIDAD AGUDA CON *Hydra attenuata* ……59

7.7.1. ENSAYOS TOXICIDAD DEL AGUA (HUMEDAL *CARABALO*)……...59

7.7.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam……59

7.8. FRACCIONAMIENTO, AISLAMIENTO BIOGUIADO……. ..59

8. CONCLUSIONES……....61

9. RECOMENDACIONES…… ..62

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…….. ..63
11. ANEXOS…….. 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotointerpretación multitemporal (1957 - 1998).....3

Figura 2. Humedal *Avispal Carabalo*. **A** junio de 2011, **B** junio de 2013.....6

Figura 3. Morfología de *Azolla sp.* del humedal *Carabalo* 8

Figura 4. Distribución geográfica de *Azolla* en el mundo representada con puntos blancas 9

Figura 5. Reportes de *Azolla filiculoides* para Colombia 2014.....10

Figura 6. Morfología *Daphnia magna* 14

Figura 7. Morfología *Hydra attenuata*.....16

Figura 8. Diagrama de extracción del material vegetal. 22

Figura 9. Carta de control de sensibilidad de *Daphnia magna* 25

Figura 10. Carta de control de sensibilidad en *Hydra attenuata*.....32

Figura 11. Afloramiento *Azolla*, muestreo Diciembre 2013.....36

Figura 12. Afloramiento *Azolla*, muestreo Abril 2014.....37

Figura 13. Pliego testigo de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam N° Colección 569768...38

Figura 14. Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam (alcaloides).....52

Figura15 Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam (flavonoides) 53

Figura 16. Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam (saponinas).....54

Figura17. Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam (taninos).....55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en especies del género *Azolla*.....11

Tabla 2. Condiciones de muestro, mes de diciembre, 2013.....19

Tabla 3. Condiciones de muestro, mes de abril, 2014.....19

Tabla 4. Condiciones de la cromatografía en capa delgada (ccd) de los extractos de *Azolla* 23

Tabla 5. Condiciones del cultivo de *Daphnia magna*.....23

Tabla 6. $CL_{50\text{-}24h}$ de dicromato de potasio en *Daphnia magna* 25

Tabla 7. Anova carta de sensibilidad utilizando *D. magna*.....29

Tabla 8. Condiciones para el cultivo de *Hydra attenuata*.....29

Tabla 9. Valores de K 31

Tabla 10. Ensayo de sensibilidad con $K_2Cr_2O_7$ con *Hydra attenuata* 32

Tabla 11. Análisis estadístico resultados (Anova) *H. attenuata*.....33

Tabla 12. *Azolla*: Pérdida por secado 38

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua del humedal *Carabalo* (diciembre, 2013 – abril, 2014).....40

Tabla 14. Extracción de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.....49

Tabla 15. Pruebas colorimétricas de los extractos *Azolla* aff. *filiculoides* Lam....50

Tabla 16. Rfs de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.....51

Tabla 17. Ensayos preliminares de toxicidad de las muestras de agua del Humedal *Carabalo* Punto 1 y 2 muestreos Diciembre 2013 – Abril 2014 *D. magna*.....59

Tabla 18. Rendimiento fracciones enriquecidas en alcaloides de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.....60

1. INTRODUCCIÓN

El espejo de agua del humedal *Carabalo,* ubicado en el Valle del Cauca, se encuentra completamente cubierto por una planta flotante perteneciente al género *Azolla,* lo cual ha afectado sus procesos biológicos y en consecuencia, se ha notado una disminución en la abundancia de peces, base de alimentación y economía en la comunidad de Quinamayó (Valle del Cauca).

La sobrepoblación de esta planta ha llevado a la comunidad quinamayoreña a utilizarla como alimento para la cría de animales domesticados y abono orgánico, lo cual es preocupante, pues no se han realizado estudios fitoquímicos que hagan referencia a los metabolitos secundarios; los cuales podrían presentar actividad tóxica para otros organismos. Por ello, *Azolla sp*. presente en el humedal *Carabalo* podría representar un riesgo biológico para el ecosistema y la comunidad, dada la falta de conocimiento sobre aspectos básicos como el toxicológico, podría presentarse un impacto negativo sobre las poblaciones animales, vegetales y microbianas y sobre las poblaciones asentadas en sus márgenes, las cuales podrían verse alteradas por el cambio en la dinámica del humedal.
El humedal Carabalo puede constituirse en un entorno de aprendizaje de la caracterización y utilización racional, por parte de los pobladores, extrapolando a la vida cotidiana, los hallazgos que emanen de esta investigación y posiblemente generar una propuesta ecológica y sustentable, ya que *Azolla* es capaz de captar y fijar nitrógeno cuando se presenta una simbiosis con una cianobacteria (*Anabaena)* y se podría utilizar como un biofertilizante natural (Castro *et al.*, 2003; Lechno-Yossef & Nierzwicki-Bauer, 2003).

Como un aporte a la utilización segura de *Azolla sp.*, se realizó el aislamiento y caracterización colorimétrica y cromatográfica de los metabolitos secundarios presentes en *Azolla sp*. proveniente del humedal *Carabalo*,así como la evaluación preliminar de toxicidad aguda, sobre organismos acuáticos.

Los organismos de prueba seleccionados fueron: *Daphnia magna e Hydra attenuata* por su amplia distribución geográfica, fácil cultivo en laboratorio, corto período de vida, elevada y constante sensibilidad a tóxicos, uniformidad en las poblaciones, representatividad en su nivel trófico. Adicionalmente permiten evaluar de forma preliminar la toxicidad de los extractos y fracciones que contienen metabolitos secundarios presentes en la planta objeto de estudio. Lo anterior con el fin aportar elementos de juicio sobre la toxicidad de *Azolla sp.*, además de evidenciar el tipo de metabolitos secundarios como una contribución a la utilización segura de esta planta, presente en el humedal *Carabalo*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. HUMEDAL CARABALO O AVISPAL

Descripción general

Entre los años 1958 y 1970 se sitúa la formación de El Avispal o *Carabalo* debido al corte del meandro por la margen izquierda del río Cauca y la consolidación de un tapón que cortó el flujo superficial de caudales hacia el antiguo cauce. Sin embargo, en el extremo sur del humedal había un canal natural de comunicación entre el río y el nuevo humedal a través del cual se producía el flujo y el reflujo de caudales (figura 1) (CVC, 2012), en la fotografía de 1998 se observa la separación completa del humedal con respecto al río. Pero hace aproximadamente 3 años que aguas del río no entran al humedal, haciendo que el canal se tapone. En la actualidad las aguas que recibe el humedal, corresponden sólo a aguas lluvias.

Figura 1. Fotointerpretación multitemporal (1957 - 1998)
Tomado de: Grupo Sistemas de Fuentes (CVC, 2012)

Localización

El humedal *Carabalo* se ubica en el departamento del Valle del Cauca (Colombia), municipio de Jamundí, corregimiento de Quinamayó, vereda El Avispal. Con coordenadas 3°1´55´´N y 76°32´58´´W DATUM> WGS84, se encuentra a una

altitud de 970 msnm, su cuenca hidrográfica es el río Cauca. Los centros poblados más cercanos son los corregimientos de Quinamayó y Villa Paz. El Avispal se localiza frente a la abscisa kilómetro 43 a 200 metros del río Cauca, sobre la margen izquierda. Es un humedal tipo léntico asociado al río Cauca (CVC, 2012).

Descripción climatológica

En el valle alto del río Cauca se presentan temperaturas que normalmente oscilan alrededor de los 24ºC durante todo el año. El régimen de lluvias es bimodal, siendo los meses de marzo a junio y septiembre a diciembre los de mayores precipitaciones. Las precipitaciones máximas mensuales en la zona varían en promedio entre 200 mm (aprox.) en el mes de abril y 40 mm (aprox.) en el mes de agosto (CVC, 2012).

La evaporación media mensual varía entre 73,6 mm (marzo) y 149,6 mm (agosto); la humedad relativa no presenta grande fluctuaciones y se reporta un valor medio mensual máximo de 84% en marzo y un mínimo de 69,2% en agosto (CVC, 2012)

Características ecológicas

En general las áreas aledañas a la madrevieja el Avispal han sufrido el reemplazo del bosque seco tropical (bs-T) por finca tradicional: cítricos (naranjos, mandarinos), papaya, plátano, zapote, maracuyá, pocos sembradíos de maíz, yuca y árboles de iracon, (iraca), cacao y la ganadería extensiva usando pastos naturales y mejorados. En estos cultivos no se usan fertilizantes sintéticos sino materia orgánica, producto de los residuos agrícolas. (CVC, 2012; Isajar & Isajar, 2013).

Una pequeña parte del humedal presenta cobertura vegetal arbórea natural (bosques ripario y de guadua) y está estructurada en relictos de mediana conectividad, se localiza en zonas de ribera e inundables del río Cauca y adyacente al cuerpo lagunar. También se encuentran pastizales, zarzas cachimbos, correspondiendo al paisaje natural del humedal (CVC, 2012; Isajar & Isajar, 2013).

De acuerdo con los resultados de un análisis fisicoquímico y bacteriológico adelantado en el año 2006 por la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC), El *Avispal* presentaba una temperatura adecuada para el desarrollo de la vida acuática; niveles bajos de oxígeno disuelto (OD< 0,5 mg/L); el agua presentaba niveles normales de Ca^{2+}:15 mg/L Mg^{2+}:7,20 mg/L; Na^{+}:1,14 mg/L y K^{+}:2,54 mg/L, bicarbonatos, 86,03 mg/L y sulfatos, 5.67 mg/L y una baja concentración de aguas residuales de lavado; concentraciones bajas de fosfatos 0,07 mg/L, nitratos<0,4 mg/L, nitritos <0,003 mg/L; cloruros 1,14 mg/L, $DBO_5$4,29 mg/L y DQO 23,13 mg/L; los parámetros de turbiedad 13,33 NTU, color 81,87 U indican que el agua no era apta para consumo (Decreto 1594 del 1984 Nivel Nacional de los Ministerios de Agrícultura y Salud de la República de Colombia). Los niveles de nitrógeno total 2,23 mg/L y fósforo eran demasiado altos, con respecto a perimitidos por el Decreto anterior, esto ha contribuido a la eutroficación del humedal (CVC, 2006).

2.1.1. EL HUMEDAL CARABALO Y *Azolla sp*.

El humedal era un sitio turístico, y banco de peces provenientes del río Cauca y sembrados por la CVC, el agua no tenía olor ni sabor desagradable y no se evidenciaba en ningún espacio la planta acuática *Azolla sp.*

Hace 8 años hubo un evento de pesca en donde fueron invitados pescadores de toda la región al humedal, los cuales trajeron atarrayas y botes; un mes después se nota la presencia de diminutas plantas dispersamente localizadas en el espejo de agua, con un color verde que al poco tiempo se transformaba en rojizo, con pequeñas pintas blancas y empieza a cubrir de manera acelerada el espejo de agua; este proceso tomó aproximadamente 6 meses.

Antes que las aguas del río Cauca dejaran de nutrir al humedal, la población de plantas disminuía, pues se abría el canal de desagüe del humedal al río, pero siempre quedaban plantas que se reproducían de nuevo. Hace cinco años que el

agua del río no tiene contacto con el humedal, en consecuencia el espejo de agua está totalmente cubierto por la planta acuática (figura 2).

Figura 2.Humedal *Avispal Carabalo.***A** junio de 2011, **B** junio de 2013

A. Tomado de Grupo Frailejones -Maestría en Educación Ambiental. 2011. (http://frailejones.blogspot.com/p/fotos-galeria.htmL). Consultado 16 de julio 2013.
B y C. Tomado de laFotografía de Profesor Leider Balanta, Institución Etnoeducativa Sixto María Rojas, Quinamayó (Valle del Cauca). Junio del 2013

El humedal *o Carabalo* es un ecosistema que actualmente se ve afectado por las prácticas agropecuarias de la zona circundante y la pérdida del canal natural de comunicación entre el río y el nuevo humedal que originaba el flujo y el reflujo de caudales que podría explicar la invasión de *Azolla* en el cuerpo de agua del humedal.

EL humedal *Carabalo o Avispal*, constituía un eje importante de la alimentación y economía en la comunidad de Quinamayó (Valle del Cauca), pues era banco piscícola y de otras especies, de las cuales los quinamayoreños se abastecían; ahora con el afloramiento de *Azolla sp.* la dinámica del humedal parece haber

cambiado, por lo que se evidencian diferencias en la composición biótica del ecosistema.

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN DELGÉNERO *Azolla*

El nombre de *Azolla,* se deriva del griego *azo* (secar) y *allyo* (morir), significa que la planta muere cuando se seca. Anteriormente se clasificó dentro de la familia *Salvinaceae*, orden Salviniales, ahora incluida en la familia monotípica *Azollaceae* (Waseem *et al.,* 2012). El género *Azolla* fue establecido por Lamarck en 1783, se trata de un helecho acuático flotante. Actualmente dentro de este género se encuentran las especies, *A. caroliniana* Willd*, A. filiculoides* Lam., *A. microphylla* Kaulf., *A cristata* Kaulf., *A. mexicana* Presl., *A. pinnata* R. Br., *A. nilotica* Decne, entre otras. (Wagner 1997; Pereira *et al.,* 2011).

Se considera una especie invasiva, si las condiciones de temperatura, luz, fotoperíodo y nutrientes entre otras son óptimas, está puede reproducirse ampliamente y formar un denso ¨tapete vegetal¨ (Pereira & Vasconcelos, 2014)

La clasificación taxonómica de *Azolla sp.* Lam (Waseem *et al.,* 2012):

Dominio: Eucariota.
Reino: Plantae
División: Pteridophyta
Clase: Polypodiopsida
Orden: Salviniales
Familia: Azolaceae
Género**:** *Azolla*

Estas plantas tienen un rizoma principal, del cual derivan unos secundarios, las raíces absorben los nutrientes directamente del agua. Cada hoja está profundamente bilobulada (lóbulos ventral y dorsal), el lóbulo dorsal es clorofílico y el lóbulo ventral está parcialmente sumergido, es incoloro y proporciona flotabilidad (Figura 3). En el lóbulo dorsal de la hoja se encuentra un

endosimbionte, una cianobacteria *Anabaena azollae,* capaz de fijar nitrógeno atmosférico (Lumpkin & Plucknett, 1980; Pereira *et al.,* 2011; Sadeghi *et al.,* 2013a).

Figura 3. Morfología de *Azolla sp.* del humedal *Carabalo*
(Tomada por: profesor Leider Balanta)

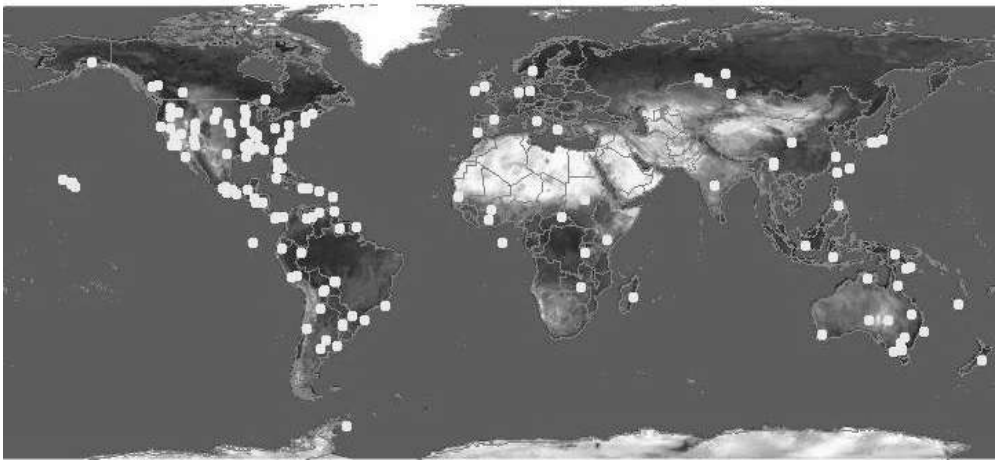
Azolla sp. se encuentra en los cinco continentes (figura 4), es una especie originaria de climas cálidos y templados del continente americano así como de Asia y Australia (Sculthorpe, 1967). En Colombia este género presenta una distribución asociada a una altura entre 50 a 4200 msnm.

En el humedal *Carbalo* se observa que el helecho se reproduce vegetativamente y no sexualmente.

Al género *Azolla* se le ha usado como fijador de nitrógeno, atribuído a la presencia de *Anabaena azollae* Stras, que crece en las cavidades de las hojas (Moore, 1969; Hove & Lejeune, 2009; Pereira & Vasconcelos, 2014).

Figura 4. Distribución geográfica de *Azolla* en el mundo representada con puntos blancos

(Tomada de: Sadeghi *et al.,* 2013a)



Azolla sp. puede variar de coloración, desde verde hasta rojo brillante, dependiendo de las estaciones y los cambios geoclimáticos (Kösesakal, 2014). En Colombia se ha encontrado en varios departamentos (Figura 5)

Se han descrito varios usos para este género como: biofertilizante en el cultivo de arroz, abono verde, alimento para animales y humanos, producción de hidrógeno, producción de biogas, purificadoras de agua, en el control de arvenses y como repelente de mosquitos, entre otros (Wagner 1997; Leterme *et al.,*2009; Waseem *et al.,* 2012)

Figura 5. Reportes de *Azolla filiculoides* para Colombia 2014, representados con estrellas verdes

(Tomado de Instituto de Ciencias Naturales, UNAL consultado 05/06/2014)

Se han descrito y evaluado sus metabolitos secundarios, de los cuales se han reportado diversas aplicaciones (Tabla 1). Se sabe que la naturaleza de estos, se encuentra influenciada por el ambiente que circunda a la planta que los biosintetiza, por lo cual las características de los metabolitos pueden diferir de un ecosistema a otro (Verpoorte *et al.,* 2002; Vanisree *et al.,* 2004).

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en especies del género *Azolla*

Especie	**Metabolito secundario**	**Disolventes utilizados**	**Actividad biológica**	**Características de recolección**	**Referencias bibliográficas**
A. pinnata	Flavonoides, Compuestos fenólicos, Taninos, Carbohidratos, saponinas y ácidos carboxílicos.	Agua Acetona Benceno Cloroformo Metanol Etanol	Inhibidores de crecimiento bacteriano, actividad frente a varios patógenos y antioxidante Bioactividad en contra de varios patógenos, actividad antioxidante, antibacteriana Antimicrobiana, antioxidante y citotóxica Antifúngica, antioxidante, anticancerígena antiinflamatoria y adelgazante	Plantas sanas y enfermas Tasmil Nadu, India.	Muraleedharan nair *et al.,* 2011
A. microphylla	Compuestos fenólicos, taninos, esteroides, triterpenoides, glicósidos de antraquinonas, azúcares y aminoácidos	Metanol	Antimicrobiana, bioactividad en contra de varios patógenos, antioxidante, depleción de hierro, biofertilizante	Plantas sanas, colectadas en invierno (color rojo) y verano (color verde). Nueva Deli, India.	Abraham & Vidhu, 2012. Abraham, 2013
A. *filiculoides*	αy β clorofila, carotenoides, xantofilas, compuestos fenólicos	Metanol	Antioxidante Bioacumuldor de arsénico	Cultivos del Colegio de Posgraduados de Chapingo. México	Sánchez-Viveros *et al.,* 2011

A. *filiculoides*	Alcoholes, aldehídos, alcanos y cetonas (cultivo de laboratorio); aldehídos, alcoholes, terpenoides y alcanos	*n*-pentano, hidrodestilación	Repelente o atrayente dependiendo de proporción de alcoholes, aldehídos y otros compuestos.	Cultivos de laboratorio y jardín botánico de la Universidad de Lisboa	Pereira *et al.,* 2009
A. *filiculoides*	Saponina (isovitexin 7-O-glicósido) y homoorientin (luteolin 6-C-glicósido)	Éter etílico y acetato de etilo		Colectadas en invierno y otoño. Lisboa, Portugal	Texeira *et al.,* 2001
A. *filiculoides Lam.*	3-deoxiantocianina, glicósidos: luteolinidina y apigenina	Ácido fórmico y metanol		Colectadas en invierno y otoño Amakubo, Tsukuba, Japón	Iwashina *et al*., 2010
A. caroliniana	glicósidos de 3-deoxiantocianina	Ácido fórmico y metanol		Amakubo, Tsukuba, Japón	Iwashina *et al*., 2010

Adicionalmente se han se han evidenciado varios usos para *Azolla*, tales como: biofertilizante en el cultivo de arroz, abono verde, alimento para animales y humanos, fuente de obtención de hidrógeno, producción de biogas, purificador de agua, en el control de arvenses y como repelente de mosquitos, entre otros (Wagner 1997; Leterme *et al*., 2009; Waseem *et al.,* 2012).

En Colombia Leterme *y cols.* (2009) realizaron un estudio sobre el valor nutricional de *Azolla filiculoides* en cerdos, encontrado que la planta contenía entre 130 - 230 g de proteína digerible por kg; también se reportaron varios polisacáridos pero estos fueron pobremente digeridos por los cerdos; el contenido mineral de *Azolla filiculoides* fue alto*,* mostrando la gran capacidad de la planta para absorber y acumular metales; esta última característica se presentó como la mayor ventaja nutricional, pues si bien las proteínas encontradas tienen un buen balance de aminoácidos, son poco digeribles por los cerdos. Cabe señalar que no se han reportado estudios fitoquímicos de *Azolla sp.,* presente en Colombia, ni de su toxicidad, los cuales puedan contribuir al uso seguro de la planta. Además, *Azolla*

sp., podría tener un potencial uso en diversas actividades como las mencionadas anteriormente. Con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre esta planta, mediante el aporte a la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en la *Azolla sp.* del humedal *Carabalo* y su evaluación toxicológica preliminar, se ha planteado realizar ensayos de toxicidad aguda usando como organismos de prueba *Daphnia magna e Hydra attenuata.*

2.3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

Las pruebas de toxicidad aguda ponen de manifiesto los efectos adversos, resultado de una sola exposición a los extractos, que servirán como guía para conocer un rango de concentraciones en las cuales se afecta a los organismos de prueba (EPA, 2002; Pretti *et al.,* 2009).

2.3.1. ORGANISMOS DE PRUEBA

2.3.1.1*. Daphnia magna*

Es un microcrustáceo de agua dulce que se usa ampliamente en toxicología acuática, es un modelo para estudiar tolerancia a varios compuestos químicos (Mayer & Ellersieck, 1986; Martins *et al.,* 2007; Persoone *et al.,* 2009).

Su clasificación taxonómica es:

Reino: Animalia
Orden: Cladocera
Phylum: Arthropoda
Familia: Daphniadae
Clase: Crustacea
Subclase: Brachiopoda
Género: *Daphnia*
Especie: *magna*

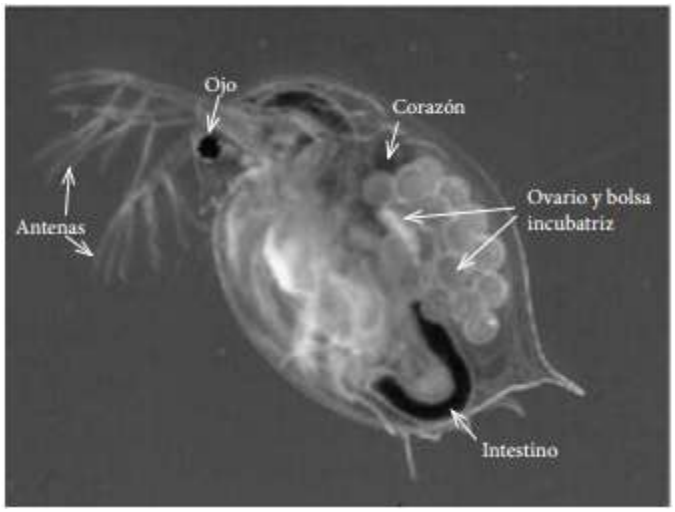
Por ser la especie de mayor tamaño en el género, los cambios en comportamiento son más visibles. Los ensayos con este organismo permiten determinar la letalidad potencial de compuestos químicos, de aguas residuales domésticas e industriales, de lixiviados, de aguas superficiales o subterráneas y del agua potable, entre otros (Castillo, 2004).

Este organismo de prueba tiene la ventaja de tener características morfológicas que proporcionan información acerca de la toxicidad de un determinado compuesto. *Daphnia magna* presenta un cuerpo semitransparente cubierto por un caparazón que muda en promedio cada tercer día y es indicador de crecimiento de este organismo en su primera fase de desarrollo. En este organismo es posible observar el intestino, el corazón y la cavidad donde deposita los huevos (figura 6) (Valenzuela, 2002; Villegas-Navarro *et al.,* 2003; Persoone *et al.,* 2009).

Para el bioensayo se utilizan neonatos menores a 24h, con los datos obtenidos se calcula la CL_{50} (concentración letal 50), para lo cual se puede utilizar el modelo estadístico Probit (Castillo, 2004)

Figura 6. Morfología *Daphnia magna*

(Tomado de Castillo, 2004)



Daphnia magna es uno de los principales contribuyentes del zooplancton en la mayoría de los ecosistemas de agua dulce (McInnis, 1989). Estos organismos son importantes en la cadena alimenticia acuática, porque sirven de alimento para

peces juveniles y adultos, hydras, insectos maduros y otros organismos (Smirnov, 2014).

2.3.1.2. *Hydra attenuata*

Es un pólipo, perteneciente a la clase *Hydrozoa* y al género *Hydra,* con una amplia distribución geográfica.

Está clasificada taxonómicamente como:

Reino: Animalia
Orden: Atecados
Phylum: Cnidaria
Familia: Hydridae
Clase: Hydrozoa
Género: *Hydra*
Especie: *attenuata*

Son organismos pluricelulares y sus células se disponen en dos capas: la epidermis y la gastrodermis, separadas por una mesoglea gelatinosa, la cual encierra una cavidad digestiva continua que se comunica directamente con el exterior a través de una abertura o boca (figura 7)(Díaz-Báez *et al.,* 2004).

Es empleada como organismo de prueba por la facilidad de cultivo en el laboratorio, rápida reproducción, su estructura primaria (ectodermo, mesodermo y endodermo) favorece el intercambio intra e intercelularmente, aumentando su potencial para la detección de tóxicos, ante los que responden presentando notables cambios en la conformación de los tentáculos y en algunas oportunidades puede presentar cambios en la estructura corporal. *Hydra* se expone a diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar por un período de 24, 48, 72 y 96 horas, los cuales permiten evidenciar cambios morfológicos en el organismo (Castro, 2004; Díaz-Báez *et al.,* 2004; Quinn *et al.,* 2012).

Los ensayos de toxicidad aguda utilizando como organismo de prueba *H. attenuata,* permiten cuantificar efectos letales y subletales y tienen una duración máxima de 96 horas. Con este ensayo es posible calcular de forma simultánea las concentraciones efectivas media y letal (CE_{50}, CL_{50}) con respecto al tiempo de exposición dado. (Díaz-Báez *et al.,* 2004; Trotiier *et al.,* 1997; Castro, 2004; Quinn *et al.,* 2008).

Figura 7. Morfología *Hydra attenuata*

(Foto laboratorio de Ecotoxicología, IBUN)

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué tipo de metabolitos secundarios tiene la *Azolla sp. d*el humedal *Carabalo* y qué efectos tóxicos presentan?

4. JUSTIFICACIÓN

El estudio de las especies vegetales es necesario para fortalecer el conocimiento acerca de la amplia variedad de flora presente en el país, siendo Colombia uno de los países más biodiversos del mundo, está provista de miles de especies del reino *Plantae*, en las que se han reportado muchos usos (Política Nacional de Biodiversidad, 1996).

El caso de *Azolla sp. e*s interesante, pues además de formar parte de la biodiversidad, es utilizada en diversas aplicaciones sustentadas en su composición química, variedad en metabolitos secundarios y rápida reproducción. Sin embargo, el afloramiento excesivo de la misma perturba ecosistemas como es el caso del humedal *Carabalo*, donde se han observado efectos negativos como la disminución de especies animales y vegetales en número y variedad, afectándose también a las comunidades humanas cuyo banco de alimentos se basaba en la fauna de dicho humedal (Isajar & Isajar 2013).

Por lo anteriormente expuesto, es importante realizar estudios de los parámetros fisicoquímicos del humedal para tratar de establecer qué posibles características podrían estar influenciando el afloramiento de *Azolla sp.* y también evidenciar si estos parámetros fisicoquímicos han variado de acuerdo con la nueva dinámica del humedal.

Teniendo en cuenta que la comunidad, está utilizado a *Azolla sp.* como alimento para la cría de animales domesticados y como abono orgánico, es relevante aislar y caracterizar el tipo de metabolitos secundarios que contiene y evaluar su toxicidad preliminar utilizando bioensayos con organismos de prueba acuáticos, con el fin de realizar un aporte al uso seguro de *Azolla sp.*

Adicionalmente el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios, será un valioso aporte al conocimiento sobre la calidad nutricional de la planta, dado que plantas de este género se están utilizando como abono orgánico, en cultivos de arroz. En Ecuador se adelanta todo un programa para el uso de *Azolla sp.* como un fertilizante alternativo del arroz (Montaño, 2013). Teniendo en cuenta que la zona donde se ubica el humedal, es arrocera, sería una contribución para su uso en esta práctica y así obtener mejores rendimientos en los cultivos.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los principales metabolitos secundarios en los afloramientos de *Azolla sp.* presente en el humedal *Carabalo* y evaluar su toxicidad preliminar

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Identificar taxonómicamente la especie de *Azolla sp*. presente en el humedal *Carabalo*.

II. Caracterizar parámetros fisicoquímicos del cuerpo de agua que podrían incidir en los afloramientos de *Azolla sp.*

III. Aislar y caracterizar cromatográficamente los metabolitos secundarios presentes en *Azolla sp.*

IV. Evaluar la posible toxicidad aguda de los extractos y fracciones enriquecidas de los metabolitos secundarios de *Azolla sp.* utilizando como organismos de prueba cladóceros y cnidarios**.**

6. METODOLOGÍA

El material vegetal se recolectó en el humedal *Avispal* o *Carabalo*, ubicado en el Valle del Cauca (Colombia), municipio de Jamundí, corregimiento de Quinamayó, vereda El Avispal, previo permiso de acceso a recursos genéticos.

6.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se colectó el material vegetal (66,2 kg) en diferentes puntos del humedal en 2 épocas del año (diciembre 2013 y abril 2014), con el fin de evidenciar si hay cambios morfológicos en la planta y en el tipo y abundancia de los metabolitos secundarios, debido a factores geoclimáticos.

Las condiciones del muestreo para cada fecha se muestran en las tablas 2 y 3

Tabla 2. Condiciones de muestro, mes de diciembre, 2013

Muestreo N° 1, mes de diciembre, 2013	
Temperatura ambiente	29 °C
Humedad relativa	62 %
Puntos de muestreo	2
Hora toma muestra	2 – 5 pm
Día	Soleado
Temperatura agua	20 °C

Tabla 3. Condiciones de muestro, mes de abril, 2014

Muestreo N° 2, mes de abril, 2014	
Temperatura ambiente	24 °C
Humedad relativa	74 %
Puntos de muestreo	2
Hora toma muestra	2 – 5 pm
Día	Soleado
Temperatura agua	17 °C

Para cada punto de muestreo se obtuvieron dos muestras (muestra de análisis y contramuestra), las cuales se pesaron y colocaron en bandejas cubiertas con papel periódico y fueron secadas a temperatura ambiente (24-29°C), hasta peso constante (aproximadamente tres días), se molió, pesó y se calculó la pérdida por secado, se almacenaron y transpotaron en contenedores de plástico, desde el punto de muestreo hasta el Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá).

Para cumplir con el primer objetivo -Identificación taxonómica de la especie de *Azolla sp.* presente en el humedal *Carabalo*- un ejemplar de herbario del material vegetal se llevó al Instituto de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, donde se realizó su clasificación taxonómica.

6.2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE MUESTRAS DE AGUA

Con el fin de caracterizar los parámetros fisicoquímicos del cuerpo de agua que podrían incidir en los afloramientos de *Azolla sp.,* se recolectó una muestra de la columna de agua en 2 sitios de muestreo del humedal (en el inicio del canal y en el extremo final en las dos épocas de muestreo seleccionadas diciembre, 2013 y abril, 2014). Las muestras de agua fueron recolectadas a la profundidad de 1 m, la primera a la entrada del canal y la segunda a la salida, empleando recipientes estériles de sello hermético, que se dispusieron en contenedores de icopor y se transportaron a una temperatura entre 4 a 6°C, para ser analizados por el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia. Los parámetros a evaluar fueron: turbidez, color, pH, alcalinidad, calcio, magnesio, hierro, manganeso, ortofosfato, sólidos totales y conductividad.

La disponibilidad de nitrógeno se determinó como concentración de nitratos y nitritos y amonio, adicionalmente se obtuvieron el DBO_5, y el DQO. Con estos

datos se trató de establecer si hay relación entre la cobertura de *Azolla* y las características fisicoquímicas del agua.

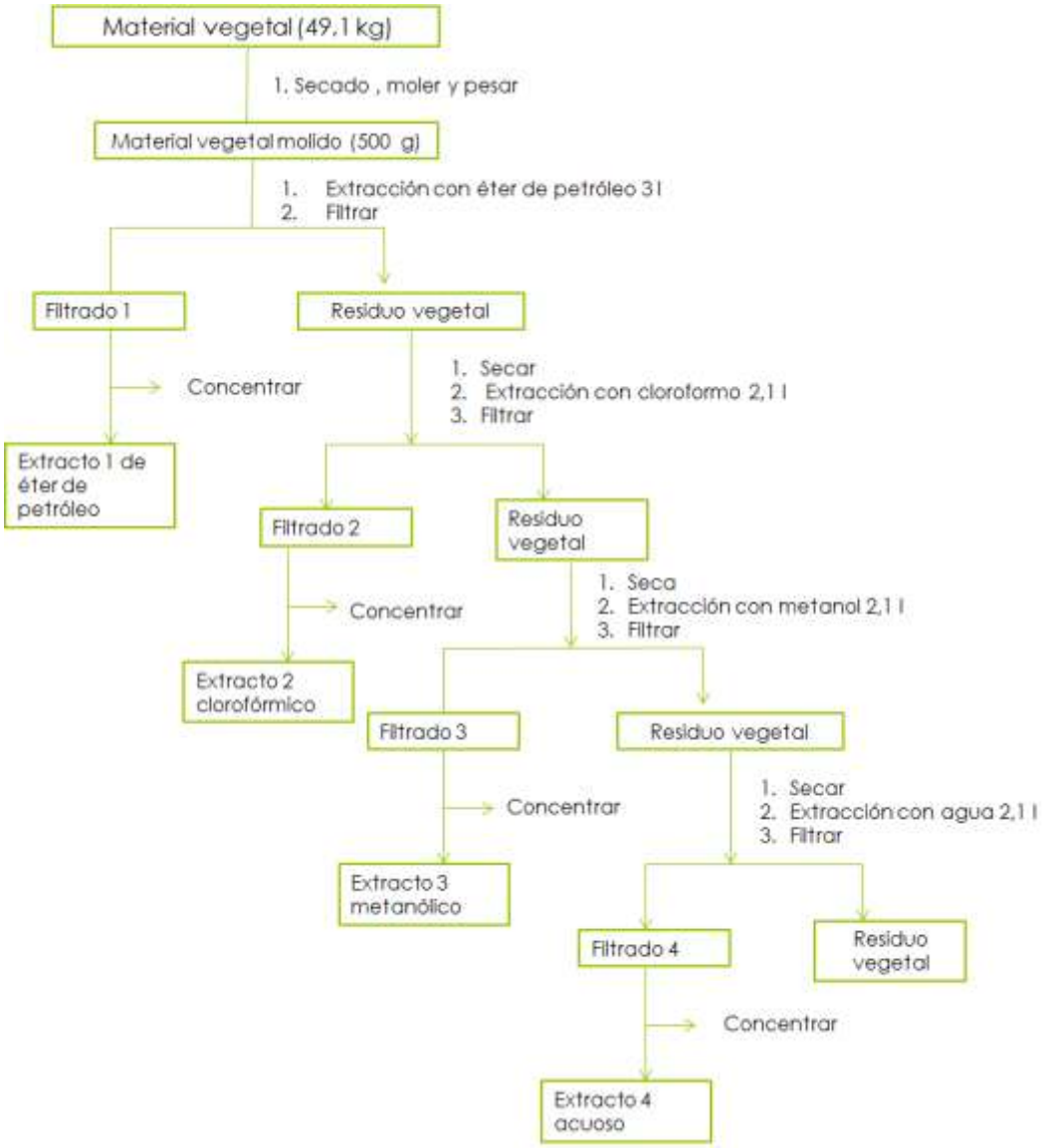
Adicionalmente a las muestras de agua se le realizaron bioensayos de toxicidad aguda con los organismos de prueba *Daphnia magna* e *Hydra attenuata.*

6.3. EL AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN *Azolla sp.*

El materia vegetal seco y molido de *Azolla sp.* se guardó en frascos de vidrio de color ámbar.

Para la obtención de los extractos, 500 g del material vegetal (planta entera) seco y molido de cada muestreo, abril y diciembre se extrajeron con cuatro disolventes de polaridad ascendente, (éter de petróleo, cloroformo, metanol y agua), en un percolador, hasta agotamiento total. El disolvente se evaporó al vacío utilizando un rotaevaporador y se pesó el extracto obtenido. Después de haber extraído el material vegetal con éter de petróleo, se secó a temperatura ambiente. Una vez seco se procedió a obtener un extracto de cloroformo y se utilizó la misma metodología para obtener los extractos metanólico y acuoso. En la figura 8, se esquematiza el diagrama de extracción del material, el cual se siguió para ambas muestras.

Figura 8. Diagrama de extracción del material vegetal



La detección de los metabolitos secundarios se hizo, para cada uno de los cuatro extractos obtenidos, preliminarmente con pruebas colorimétricas y posteriormente estos se disolvieron en en metanol, y se realizó cromatografía en capa delgada (CCD), utilizando patrones de referencia específicos para cada tipo de metabolitos secundario; cromatogramas de gel de sílice GF_{254} como fase estacionaria y diversos eluyentes como se puede apreciar en la tabla 4. Una vez eluidos los cromatogramas, se revelaron con UV 254 nm y 365 nm y con agentes cromogénicos de acuerdo con el tipo de metabolito secundario a evidenciar. Una

vez corridos y revelados los cromatogramas (figuras 13, 14, 15 y 16) se procedió a calcular los Rfs (Touchstone & Dobbins, 1992).

Tabla 4. Condiciones de la cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos de *Azolla*

METABOLITO SECUNDARIO	ELUYENTE	UV λ	REVELADOR	CONTROL POSITIVO	BIBLIOGRAFÍA
Alcaloides	Acetato de etilo-metanol (8 : 2)	365 nm	Reactivo de Dragendorff	Escopolamina	Popl *et al*., 1990
Flavonoides	Acetato de etilo - ácido fórmico acético: agua (10:1.1:1.1:2.6)	365 nm	Aspersión sucesiva de los reactivos NP (difenilboriloxietilamina al 1 % en metanol, p/v) y PEG (polietilenglicol 4000 al 5 % en metanol,p/v)	Rutina	Barrón–Yánez *et al*., 2011
Taninos	Acetato de etilo cloroformo (3:1)	254 nm	Cloruro férrico 5 %	Ácido gálico	Hernández & Luengas, 2013
Saponinas	Cloroformo-ácido acético - metanol (64:32:12)		Solución 1: Vainillina al 1% en etanol Solución 2. Ácido sulfúrico en etanol al 5 %	Diosgenina	López *et al*., 2003

6.4. BIOENSAYOS CON *Daphnia magna*

6.4.1. CULTIVO DE *Daphnia magna*

Las condiciones utilizadas para el cultivo de *D. magna* se consignan en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones del cultivo de *Daphnia magna*

Fotoperíodo	16h luz / 8h oscuridad
Luz	800 – 1000 Lux
Temperatura	20°C+/- 2°C
Oxígeno disuelto	6.0 - 8.0 mg/L
pH del medio	7.0 - 7.5
Dureza	160 – 180 mg $CaCO_3$ /L
Alimentación	4.5 x 10^6 u. algas / individuo/ día
Densidad de Población	1 *Daphnia*/100mL
Ciclo de vida	
Período de vida	30-90 días
Maduración sexual	13+/- 2 días

En el Anexo A se especifican las condiciones para el mantenimiento del cultivo.

6.4.2. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD

Se realizó una carta de sensibilidad del organismo de prueba (*D. magna*) la cual consistió en 10 bioensayos con dicromato de potasio como tóxico de referencia. Este ensayo se hizo con el fin garantizar la confiabilidad y reproducibilidad de los datos, en relación con la capacidad de respuesta de los organismos, además de servir para registrar la variabilidad natural de la especie (Silva *et al*., 2003; Persoone *et al*., 2009).

En las pruebas, se usaron neonatos de menos de 24h, estos fueron sometidos a 5 (1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 ppm) concentraciones de dicromato de potasio ($Kr_2Cr_2O_7$) y cada concentración se evaluó por triplicado. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo *D. magna*. El ensayo se evaluó a las 24 horas, se observó y registró el número de organismos muertos. Con los datos obtenidos se calculó la $CL_{50\text{-}24}$ utilizando Probit (Díaz-Báez *et al.,* 2004; Castillo, 2004).

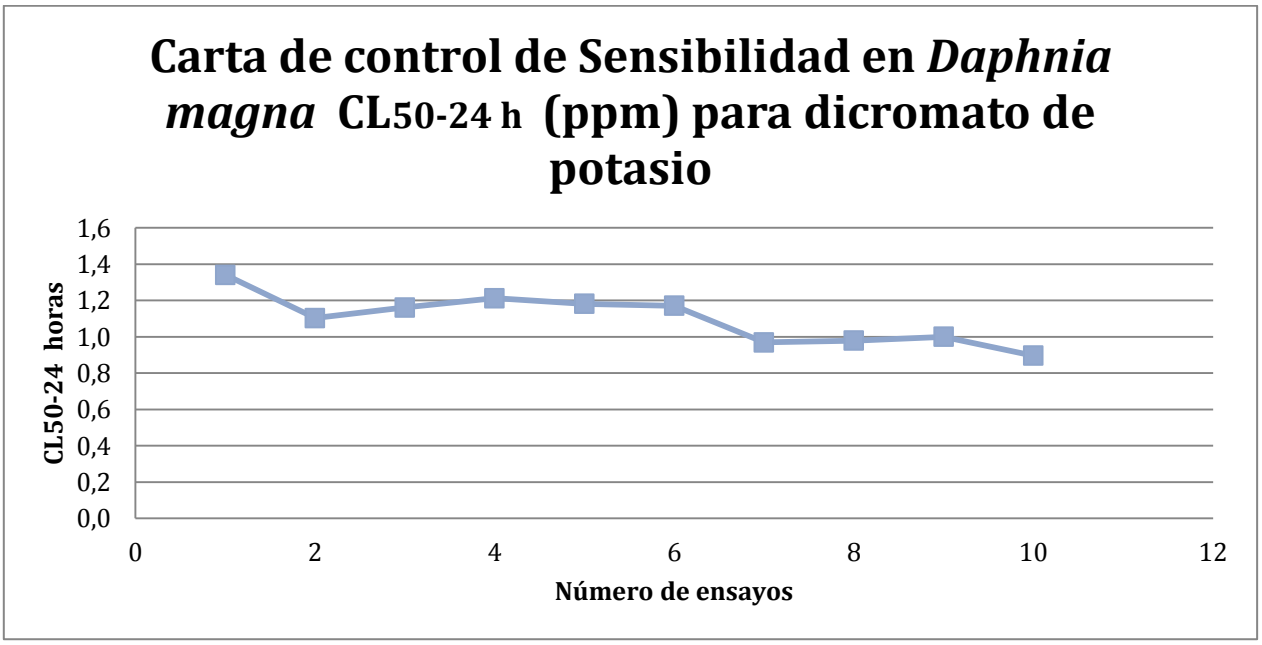
Los resultados de $CL_{50\text{-}24}$ con dicromato de potasio en *Daphnia magna* se resumen en la tabla 6 y se graficaron en la figura 8 (los datos se encuentran en el Anexo B)

El promedio de la $CL_{50–24}$ calculada utilizando Probit fue de 1.1 ppm, valor que se encuentra dentro de los límites informados en la literatura (ISO 6341:2012), 0.6–2.1 ppm para, $CL_{50–24}$

Tabla 6. $CL_{50\text{-}24h}$ de dicromato de potasio en *Daphnia magna*

Número de Ensayo	$CL_{50\text{-}24}$ (ppm)	Límites de Confianza 95%	
		Límite inferior(ppm)	Límite superior (ppm)
1	1.3	1.2	1.6
2	1.1	0.9	1.5
3	1.2	0.8	2.1
4	1.2	0.8	2.2
5	1.2	1.0	1.3
6	1.2	0.9	1.7
7	1.0	0.7	1.6
8	1.0	0.8	1.4
9	1.0	0.8	1.3
10	0.9	0.6	1.4
Promedio	**1.10**	**0.8**	**1.6**

Figura 9. Carta de control de sensibilidad de *Daphnia magna*



Análisis de varianza de los resultados obtenidos en la carta de sensibilidad para *D. magna*

El análisis de varianza (ANOVA), permite contrastar la hipótesis nula en donde las medias de más de dos poblaciones son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado.

Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: No existen diferencias significativas entre los bioensayos evaluados.

Ha: Por lo menos existe un bioensayo que difiere significativamente de los demás respecto a su valor esperado.

Con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula, se comparó el valor p con el valor del nivel de significancia (5%), Como resultado se obtuvo que el valor p> 5% así que no se rechaza la hipótesis nula, es decir no existen diferencias significativas entre los 10 bioensayos realizados, tabla 7.

Tabla 7. Anova carta de sensibilidad utilizando *D. magna*

Información de nivel de clase		
Clase	**Niveles**	**Valores**
BIOENSAYO	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CONCENTRACIÓN ppm	5	0.125 0.25 0.5 1 1.5
REPETICIÓN	3	1 2 3

Fuente	**GL**	**Suma de cuadrados**	**Cuadrado de la media**	**F-Valor**	**Pr > F**
Modelo	9	24.59	2.73	0.20	0.99
Error	140	1921.06	13.72		
Total corregido	149	1945.66			

GL: Grados de libertad

6.4.3. ENSAYOS TOXICIDAD AGUA HUMEDAL *CARABALO*

Se realizó un ensayo para cada punto de muestreo de los meses diciembre 2013 y abril 2014, es decir 4 bioensayos, con un control positivo (dicromato de potasio) y negativo (medio *D. magna*), se evaluaron 6 concentraciones 100, 50, 25, 10, 5, 2.5% v/v.

6.4.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS EXTRACTOS DE *Azolla sp*.

Los bioensayos se realizaron siguiendo el Manual de procedimientos de Bioensayos de Toxicidad Aguda – Lab. Ecotoxicología, 2002.

Con el fin de solubilizar los extractos obtenidos en los medios de los organismos de prueba, *D. magna* e *H. attenuata*, se utilizó el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), al cual se le realizaron pruebas de toxicidad preliminares y definitivas para los dos organismos. Estos resultados permitieron definir la cantidad máxima de disolvente y cosolvente a utilizar para disolver las muestras, sin que se pueda atribuir el resultado obtenido a este sino exclusivamente a los extractos.

Las concentraciones evaluadas fueron: 3, 2, 1, 0,5 y 0,25 ppm de DMSO en un tiempo de 48 y 72 horas. Los ensayos permitieron determinar que el porcentaje máximo de DMSO en solución para *D. magna* es del 2% (CL_{50-48}: 0.8 ppm mientras que para *H. atenuatta* un 1 % v/v (CL_{50-72}: 0.3 ppm).

Ensayos preliminares

Estos aportaron la información necesaria para la realización de los ensayos definitivos con los extractos de *Azolla sp*. Se tomó como variable respuesta la muerte o inmovilidad de los organismos entre el 0% y 100%. El ensayo se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

I. Se prepararon 6 concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50 y 25 ppm de los extractos a evaluar.

II. Control negativo: medio de cultivo *D. magna.*

III. Control positivo: dicromato de potasio 1,0 ppm en medio de cultivo *D. magna.*

IV. Neonatos 24±12 horas.

V. 5 neonatos por concentración.

VI. 3 réplicas por concentración.

VII. 3 mL de volumen del medio.

VIII. Tiempo de evaluación 48 horas.

IX. Análisis estadístico (PROBIT).

X. Variable respuesta: Muerte inmovilidad.

Ensayos definitivos

Estos se hicieron con el fin de determinar la concentración a la cual se observa un efecto en los organismo (CE_{50-48}), por tanto se utilizaron las concentraciones comprendidas entre la máxima concentración que no presenta efecto y la que lo presentó. Para los extractos clorofórmico y metanólico estas fueron: 250 - 500 ppm, de manera que se evaluaron las concentraciones de 500, 450, 400, 350, 300 y 250 ppm. En los extractos acuosos se evaluaron las concentraciones comprendidas entre 1000 y 500 ppm, es decir 1000, 900, 800, 700, 600 y 500 ppm.

Los ensayos se realizaron bajo las siguientes condiciones:

I. Control negativo: medio de cultivo *D. magna.*

II. Control positivo: dicromato de potasio 1,0 ppm en medio de cultivo *D. magna.*

III. Neonatos 24±12 horas.

IV. 10 neonatos por concentración.

V. 3 réplicas por concentración.

VI. 3 mL de volumen del medio.

VII. Tiempo de evaluación 24 y 48 horas.

VIII. Análisis estadístico: PROBIT

6.5. BIOENSAYOS CON *Hydra attenuata*

6.5.1. CULTIVO DE *Hydra attenuata*

Las condiciones para el mantenimiento del cultivo de *H. attenuata*, se resumen a continuación en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones para el cultivo de *Hydra attenuata*

Fotoperíodo	16 h luz / 8 h oscuridad
Luz	800 Lux
Temperatura	20°C+/- 2°C
pH del medio	6.9 - 7.0
Alimentación	Nauplios de *Artemia salina*

Los componentes del medio de cultivo para *Hydra* se muestran en la tabla 9 y el procedimiento de preparación se encuentra en el Anexo C.

Los cultivos de *Hydra*, se desarrollaron en cristalizadores de 2 L con un volumen aproximado de 350 mL de medio.

La alimentación de *Hydra*, se hace con nauplios de *Artemia salina,* producto de la eclosión de quistes de este organismo.

6.5.2. ENSAYOS DE REPRODUCCIÓN *Hydra* attenuata

Los ensayos de reproducción se realizaron durante todo el tiempo de la fase experimental con este organismo.

El ensayo se llevó a cabo cada 15 días, aplicando el siguiente protocolo: cada uno de los tres acuarios se dividieron en cuatro cuadrantes. De cada cuadrante se toman 5 hydras que presentan un hidrante, y 5 hydras sin hidrante. Estas se colocan en una caja de Petri con medio de cultivo *hydra* y diariamente, durante 8 días, se registró el número de hydras y de hidrantes generados. Los procesos de limpieza y alimentación son los mismos utilizados para los cultivos masivos de *H. attenuata*.

Los resultados obtenidos se someten a un análisis de regresión lineal con las siguientes variables:

Número de días *vs* N° total de hydras – hidrantes.

Así se tendrá una ecuación: $y=mx+b$

donde:

y= tiempo (días)

x= N° de hydras – hidrantes.

El cálculo del tiempo en el cual la población se duplica (T), para obtener la constante de crecimiento K, utilizando la siguiente ecuación:

$$K= Ln2/T$$

El valor de K es importante puesto que este debe estar entre 0.25 y 0.35 (Brugés 2006) ya que un valor por debajo del límite inferior puede significar que en el cultivo no hay un óptimo desarrollo de los organismos; por el contrario cuando se sobrepasa el límite superior es un indicativo de baja la sensibilidad en los organismos de prueba.

Los valores de K obtenidos en los ensayos realizados en el laboratorio, se reportan en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de K

Ensayo	K (horas^{-1})
1	0,35
2	0,30
3	0,28
4	0,31
5	0,27
6	0,32
7	0,29

El valor encontrado para la constante de crecimiento K (horas^{-1}) fue en promedio 0,3 (horas^{-1}), valor que se encuentra dentro del rango establecido en la literatura 0,3-0,4 horas^{-1} (Trotier *et al*., 1997) y aceptable para el desarrollo experimental.

6.5.3. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD

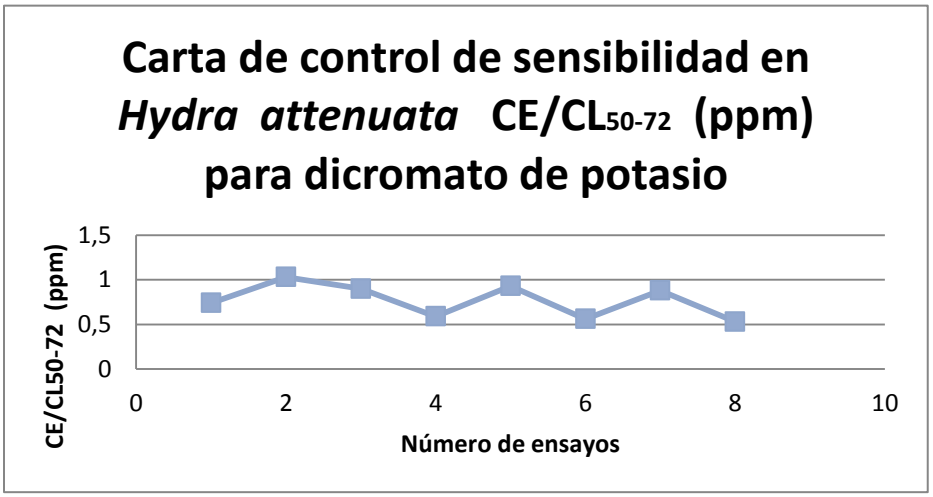
Para los ensayos de sensibilidad, se usó dicromato de potasio como tóxico de referencia. Se emplearon 5 concetraciones (2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 ppm), 3 réplicas por cada concetración y 5 hydras por pozo para los ensayos definitivos**.** Se determinó la CE_{50} y $CL_{50.}$ Para calular la concentración efectiva se tienen en cuenta el númerode organismos con efectos subletales, es decir con tentáculos globosos y cortos; para la concentración letal, se evidencaron los estados de tulipán y desintegración a las 72 horas, mediante el análisis de los datos obtenidos, utilizando el programa Lc 50 de PROBIT. Los datos se encuentran en el Anexo D.

Tabla 10. Ensayo de sensibilidad con $K_2Cr_2O_7$ con *Hydra attenuata*

Número de Ensayo	CE/CL (ppm)	Límites de Confianza 95%	
		Límite inferior (ppm)	Límite superior (ppm)
1	0,74	0,49	1,09
2	1,03	0,69	1,46
3	0,90	0,59	1,47
4	0,59	0,39	0,91
5	0,93	0,58	1,27
6	0,56	0,34	0,93
7	0,88	0,61	1,15
8	0,53	0,32	0,89
Promedio	**0,77**	**0,50**	**1,14**

El límite inferior fue de 0,50 y el superior de 1,14, en la literatura se reportan valores que oscilan entre 0,57-1,62 como intervalos óptimos de sensibilidad (Brugés, 2006).

Figura 10. Carta de control de sensibilidad en *Hydra attenuata*



Para la carta de sensibilidad de *Hydra attenuata* igualmente se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con las mismas hipótesis plateadas para *Daphnia magna.*

Ho: No existen diferencias significativas entre los bioensayos evaluados.

Ha: Por lo menos existe un bioensayo que difiere significativamente de los demás respecto a su valor esperado.

El valor p> 5% así que no se rechaza la hipótesis nula, tabla 11.

Tabla 11. Análisis estadístico resultados (Anova) *H. attenuata*

Información de nivel de clase		
Clase	**Niveles**	**Valores**
BIOENSAYO	8	1 2 3 4 5 6 7 8
CONCENTRACIÓN ppm	5	0.05 0.10 0.50 1.00 2.00
REPETICIÓN	3	1 2 3

Fuente	**GL**	**Suma de cuadrados**	**Cuadrado de la media**	**F-Valor**	**Pr > F**
Modelo	7	7.48	1.06	0.04	0.99
Error	40	1215.83	30.39		
Total corregido	47	1223.31			

GL: Grados de libertad

6.5.4. ENSAYOS TOXICIDAD AGUA HUMEDAL CARABALO

Al igual que para *D. magna* se realizó un ensayo para cada punto de muestreo (4 bioensayos), con un control positivo (dicromato de potasio) y negativo (medio *H. attenuata*), se evaluaron 6 concentraciones 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 %v/v.

6.5.5. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA DE LOS EXTRACTOS DE *Azolla sp*.

Los bioensayos se realizaron siguiendo el Manual de procedimientos de Bioensayos de Toxicidad Aguda – Lab. Ecotoxicología, 2002

Ensayos preliminares

La metodología que se utilizó se describe a continuación:

I. Se prepararon 6 concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50 y 25 ppm de los extractos a evaluar, utilizando como disolvente medio de cultivo de *H. attenuata sin* EDTA y como cosolvente DMSO al 1%.

II. Control negativo: medio de cultivo *H. attenuata* sin EDTA y DMSO al 1%.

III. Control positivo: dicromato de potasio 1,0 ppm en medio de cultivo *H. attenuata.*

IV. Hydras de tamaño similar (aproximadamente 30 días), sin hidrantes y con ayuno previo al ensayo de 24 horas.

V. 3 hydras por concentración.

VI. 3 réplicas por concentración.

VII. 3 mL de volumen del medio.

VIII. Tiempo de evaluación 24, 48 y 72 horas.

Para la evaluación de las alteraciones morfológicas (estados letales y subletales) se consideró subletalidad tentáculos globosos o cortos y para letalidad tulipán o desintegración que se presentaban a las 24, 48 y 72 horas.

Ensayos definitivos

Estos ensayos se adelantaron para obtener $CE_{50\text{-}72\ horas}$, la cual se calcula con base en el número de hydras con estados subletales (tentáculos globosos o cortos) y para el cálculo de la $CL_{50\text{-}72\ horas}$ se tomó en consideración el número de hydras que presentaban efectos letales (tulipán y desintegración).

El procedimiento que se siguió es básicamente el mismo de los ensayos preliminares pero, se diferencian en:

I. Las concentraciones se seleccionaron en un intervalo entre el 10 y el 90% de respuesta obtenida en los ensayos preliminares, para determinar subleatlidad (CE_{50}) y letalidad (CL_{50}) a 72 horas. Se prepararon para cada muestra 6 concentraciones. Para los extractos clorofórmico y metanólico se evaluaron las concentraciones de 500, 450, 400, 350, 300 y 250 ppm. Más controles negativos y positivos (medio *Hydra* y dicromato de potasio en una concentración de 1ppm).

II. 5 hydras por pozo

III. Las observaciones se hicieron, al igual que en los ensayos preliminares, cada 24 horas durante el tiempo total del ensayo (72horas).

IV. Los datos se analizaron utilizando el programa PROBIT.

6.6. FRACCIONAMIENTO, AISLAMIENTO BIOGUIADO

Este consistió en una extracción ácido - base de los extractos clorofórmicos, (Tiwari *et al*., 2011) en los cuales se encontraron metabolitos de tipo alcaloidal por CCD los cuales presentaron actividad tóxica preliminar.

Estas fracciones enriquecidas fueron sometidas a bioensayos con *D. magna*, se evaluaron 6 concentraciones en los bioensayos definitivos que correspondieron a 500, 250, 100, 50, 25, 15 ppm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas plantas se encontraron homogéneamente distribuidas en la superficie del humedal.

Muestreo Diciembre, 2013: Las plantas presentaron diferentes coloraciones, verde, rojizos, naranjas y negro (figura 11). En un solo organismo pudo notarse la

presencia de estos tres tipos de coloraciones. Las cuales fueron encontradas tanto bajo la luz directa como en la sombra. Se observó reproducción vegetativa.

Figura 11. Afloramiento *Azolla,* muestreo Diciembre 2013.

Muestreo Abril, 2014: Se encontraron plantas con características similares a las colectadas en diciembre 2013 la misma variación de colores, bajo la luz y la sombra, sólo que el color naranja se observó más abundante en los organismos (figura 12). También se evidenciaron plantas con reproducción vegetativa. Además se pudo observar que el patrón de coloración a lo largo del ciclo de vida de las plantas, era el mismo, verde, rojo, naranja y negro, cuando la planta llega a este último muere y cae al fondo del humedal.

Figura 12. Afloramiento *Azolla,* muestreo Abril 2014.

La principal diferencia en los dos muestreos, abril, 2014 y diciembre, 2013 se observó a nivel de la coloración, evidenciándose un prevalencia del color naranja en el muestreo de abril, en donde la temperatura fue más baja que en el mes de diciembre (24°C). Kösesakal (2014) encontró que a menor temperatura, se presentaban más carotenoides, los cuales podrían ser responsables de la predominancia del color naranja en las plantas.

7.2. SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

La pérdida por secado del material presenta unos porcentajes que sobrepasan el 90 porciento, como se puede observar en la tabla 12.

Tabla 12. *Azolla*: Pérdida por secado

Plantas completas	Peso planta húmeda (kg)	Peso planta seca (kg)	Pérdida por secado (%)
Muestreo N° 1, mes de diciembre, 2013	49.1	4.1	91.6
Muestreo N° 2, mes de Abril, 2014	17.1	1.5	91.3

7.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE DE *Azolla* DEL HUMEDAL *CARABALO*

El helecho acuático perteneciente al género *Azolla,* presente en el humedal *Carabalo* (Quinmayó Valle del Cauca) se identificó taxonomicamnete como *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, por el Profesor José Murillo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. En la figura 13, se muestra el pliego testigo.

Figura 13. Pliego testigo de *Azolla* aff*. filiculoides* Lam N° Colección 569768

La determinación de la especie de *Azolla,* fue fundamental en el proceso de búsqueda y análisis de información bibliográfica sobre los metabolitos secundarios reportados para esta especie.

En cuanto al afloramiento de *Azolla* en el humedal *Carabalo*, se observó que ésta representa una amenaza para las vegetación nativa del humedal, puesto que la desplaza reemplazando la flora local, estas observaciones coinciden con lo documentado por Vander Zanden & Olden, (2008) y Boets *et al*., (2009).

7.4. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE MUESTRAS DE AGUA HUMEDAL *CARABALO*

7.4.1. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y CALIDAD DE AGUA

La calidad del agua es un descriptor fundamental del medio hídrico y por ende es necesario caracterizar los parámetros fisicoquímicos del agua del humedal. Esta caracterización se realizó en las 4 muestras que fueron colectadas; dos el 15 de diciembre año 2013 y otras dos el 21 de abril año 2014, en diferentes puntos del humedal. Los datos fueron comparados con los límites establecidos para los usos del agua y residuos líquidos, contenidos en el Decreto 1594 de 1984 y en el Decreto 1575 de 2007, que dicta sobre los parámetros que debe cumplir el agua que sea destinada a consumo humano, del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial en conjunto con el Ministerio de Protección Social, de la República de Colombia.

Los sitios de muestreo se escogieron tratando de establecer una posible gradación longitudinal y/o transversal tanto en los aspectos abióticos, como bióticos todo esto asociado a los flujos de agua en la madrevieja. Además se escogieron teniendo en cuenta, la presencia en la superficie de *Azolla* aff *filiculoides* Lam*.* En tal sentido se tomaron muestras en los dos extremos del humedal. Los datos obtenidos de los dos puntos se promediaron al no encontrarse difrencias significativas entre ellos, tabla 13.

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua del humedal *Carabalo* (diciembre, 2013 – abril, 2014)

Parámetro	**Unidades**	**Método**	**Resultado**					
			M1*	M2*	Promedio diciembre	M3**	M4**	Promedio abril
Temperatura sitio de muestreo	ºC	Termómetro			**20**			**17**
Turbiedad	UNT	Nefelometría	1,12	1,23	**1,18**	33,6	48,5	**41,05**
Color verdadero	UPC	Comp Visual	150	150	**150**	45	75	**60**
pH	Unidades	Pontenciometría	7,09	7,11	**7,10**	7,3	6,9	**6,95**
Conductividad Específica	µmhos/cm 25ºC	Electrómetro	190,9	188,5	**189,7**	188,5	219	**203,5**
Alcalinidad total	mg/L $CaCO_3$	Titulación	99	102	**100,5**	38	44	**41**
Calcio	mg/L $CaCO_3$	Titulación	24	27	**25,5**	<0,1	40	**40**
Magnesio	mg/L $CaCO_3$	Cálculo	44	43	**43,5**	0,16	44	**22,08**
Hierro	mg/L Fe^{+3}	Absorción atómica	0,28	0,14	**0.1**	<0,1	0,6	**0.3**
Manganeso	mg/L	Absorción atómica	<0,05	<0,05	**<0,05**	0,16	0,78	**0,47**
Amonio	mg/L NH_4^+	Cromatografía iónica	0,2	0,15	**0,18**	<0,1	0,22	**0,11**
Nitritos	mg/L -NO_2^-	Cromatografía iónica	<0,1	<0,1	**<0,1**	<0,1	<0,1	**<0,1**
Nitratos	mg/L -NO_3^-	Cromatografía iónica	<0,1	<0,1	**<0,1**	<0,1	<0,1	**<0,1**
Ortofosfatos	mg/L PO_4^{-3}	Espectrofotométrico	<0,2	<0,2	**<0,2**	<0,2	<0,2	**<0,2**
Sólidos totales	mg/L	Gravimetría	190	178	**184**	658	1068	**863**
Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO_5)	mg/L 0_2	Incubación 20 °C	5	9	**7,00**	19	4	**11,5**
Demanda Química de oxígeno (DQO)	mg/L 0_2	Reflujo Cerrado	36	37	**36,5**	11	3	**7**

*Muestras colectadas en diciembre, 2013

**Muestras colectadas en abril, 2014

El color y la turbidez intervienen en la regulación de los procesos biológicos ya que están involucrados en la trasmisión de la luz dentro del cuerpo de agua.

La turbiedad presenta un rango entre 1,12 – 1,23 para las muestras 1 y 2 y de 33,6- 48,5 UNT, para las muestras 3 y 4, valores que son elevados respecto al Decreto 1575 de 2007, en el que el valor permisible para la turbiedad es de 2 UNT sin embargo, es necesario acotar que este valor se refiere a aguas potables para consumo humano. La turbiedad es una medida directa de lo sólidos, los cuales son principalmente producto de las fibras vegetales (biomasa de *Azolla)* y microorganismos, también se deben a la erosión del material coloidal como arcilla, fragmentos de roca y óxidos metálicos. Los valores de turbidez son útiles para establecer el grado de tratamiento requerido por una fuente de agua cruda. Esta es de gran importancia en aguas para el consumo humano y las industrias de alimento (Roldán & Ramírez, 2008).

El color es la luz no absorbida, está mayoritariamente compuesto por séston (material vivo más plancton), los lagos altamente productores o eutóficos presentan colores amarillentos, como se observa en el humedal *Carabalo*. Las muestras 1 y 2, presentan 150 UPC, mientras que para las muestras 3 y 4, 45 y 75 UPC respectivamente. Estos valores están por encima del permitido para el consumo humano (15 UPC) y de acuerdo con los parámetros de calidad de la fuente, establecidos por el Ministerio de Desarrollo Económico Dirección de Agua Potable y Saneamiento Básico, son deficientes pues superan las 40 UPC (RAS, 2000).

En la tabla 13 se puede observar que el pH en promedio se encuentra en un rango de 6,95 - 7,3. Rango que se encuentra dentro de lo estimado para aguas de consumo humano (6,5 - 9,0) y de lo estipulado para agua de uso agrícola (5 - 9,0).

La conductividad presentó un rango de 188,5 – 219 µmhos/cm para el humedal, mucho menor que los límites permisibles para agua de consumo humano (<1000 µmhos/cm).

La conductividad da cuenta del contenido de iones de las aguas y es una medida de su estado trófico y de contenido de nutrientes y productividad esperable, aguas muy oligotróficas o pobres en iones, presentarán bajas conductividades y alta resistencia. Roldan & Ramírez en el 2008, reportan que alta diversidad de especies corresponden, a menudo a bajas conductividades.

La alcalinidad en las muestras 1 y 2 fue de 99 y 102 mg/L $CaCO_3$, en las muestras 2 y 3 de 38 y 44 mg/L $CaCO_3$. Esta varió considerablemente entre las dos épocas. Las muestras de diciembre están a límite de lo pautado por el Decreto 1575 de 2007**,** para el consumo humano (100mg/L $CaCO_3$).

Las concentraciones de hierro y manganeso son importantes, pues aguas con altas concentraciones al ser expuestas al aire se tornan turbias por la acción del oxígeno. Cuando estos elementos se encuentran en bajas concentraciones dan sabores metálicos al agua. En los análisis realizados a las muestras de agua del humedal *Carabalo*, se encontraron valores de 0,14 a 0.28 mg/L Fe^{+3} y <0,05 a 0,78 mg/L $Mn^{+}7$, considerados acorde con los criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso para preservación de flora y fauna, en aguas dulces, del Artículo 45 del Decreto 1594 de 1984 (0,1 mg/L Fe^{+3} y 0,1 mg/L Mn^{+7}).

El ión amonio, es significativo dado que para los organismos es fuente de nitrógeno durante la síntesis de proteínas. En medios aeróbicos es muy baja, en el cuerpo de agua, se registraron entre <0,1 - 0,22 mg/L NH_4^+.Concentraciones superiores a 0,25 mg/L NH_4^+, afectan el crecimiento de los peces y superiores a 0,5 mg/L NH_4^+ se consideran letales (Roldán & Ramírez, 2008). Cabe señalar que la concentración del límite superior registrado para el humedal, es cercano a la concentración reportada por Roldán & Ramírez, este hecho podría estar

relacionado con la reducción en la talla de los peces, evidenciada por los pescadores de la región**.**

Los nitritos se encuentran en bajas concentraciones, especialmente en aguas oxigenadas, por su facilidad de oxidación a nitrato. En los cuatro puntos muestreados del humedal *Carabalo* fue menor a 0,1 mg/L -NO_2^-. El valor encontrado está acorde con la concentración permitida para agua de consumo humano (0,1mg/L) y agua de uso pecuario.

Los nitratos son fundamentales en el medio, porque constituyen una de las formas químicas, bajo la cual las algas y las plantas pueden incorporar en su citoplasma nitrógeno para sintetizar proteínas, los análisis mostraron concentraciones menores a 0,1 mg/L -NO_3^-. Este valor está por debajo del límite de 10 mg/L -NO_3^- permitidos para el consumo humano.

El fósforo es considerado uno de los elementos biogénicos que desempeña el papel más importante en el metabolismo biológico (Roldán & Ramírez, 2008). El ortofosfato desde el punto de vista limnológico, es el más importante porque es la forma soluble y asimilable por las plantas acuáticas y el fitoplacton. En el humedal esta forma de fósforo, se encontró por debajo de 0,2 mg/L PO_4^{-3}, lo cual podría atribuirse a las altas temperaturas del trópico, a las cuales el metabolismo de los organismos aumenta de manera que el ortofosfato es consumido rápidamente.

El magnesio en las muestras 1 y 2 fue 44 y 43 mg/L $CaCO_3$, mientras que para las muestras 3 y 4 fue de 0,16 y 44 mg/L $CaCO_3$. En promedio, estos valores superan los límites permitidos para agua de consumo humano que es 36 mg/L $CaCO_3$.

Los sólidos totales en las muestras 1 y 2 se registraron en 190 y 178 mg/L, mientras que para las muestras 3 y 4 los datos obtenidos fueron 658 y 1068 mg/L; este último valor sobrepasa el límite permitido en agua para el consumo humano (<1000 mg/L)**.** Estos sólidos pueden ser producto de las continuas erosiones del

suelo como resultado de la deforestación, perdiéndose así mismo la cobertura vegetal, lo cual pudo contribuir al aumento en la carga de sedimentos y posiblemente también es debido al aumento en la actividad pecuaria.

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), presenta un rango entre 5 – 9 mg/L 0_2 para las muestras 1 y 2 y de 4 – 19 mg/L 0_2 para las muestras 4 y 3. Según los parámetros de calidad de la fuente, es muy deficiente por ser mayor a 4 mg/L 0_2 (RAS, 2000). La DBO_5 es una medida de la concentración de elemento, que es usada por los microorganismos en la degradación de la materia orgánica biodegradable, bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura de 20°C.

La demanda química de oxígeno (DQO) es un parámetro de contaminación que mide el contenido de materia orgánica en una muestra de agua a través de la oxidación química (Márquez & Guillot, 2001). En los puntos 1 y 2 se observaron 36 y 37 mg/L 0_2, para el mes de abril.

Los resultados de DBO_5 y DQO aportan información sobre la presencia de vertimientos líquidos de aguas residuales domésticas, indicando que en el humedal son bajas y las concentraciones presentes son fácilmente degradables por la autodepuración natural.

Los datos arrojados por los análisis, sobrepasan la mayoría de los límites mínimos exigidos para agua de consumo humano (Decreto 1575 de 2007). Tales como la turbiedad y el color, parámetros que hacen poco viable su potabilización, por la cantidad y costo de los compuestos químicos que se requerirían.

De acuerdo con los resultados obtenidos, un uso recomendado para el agua del humedal es enunciado en el Decreto 1594 de 1984 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia, en el Art. 31: “ *preservación de flora y fauna, su empleo en actividades destinadas a mantener la vida natural de los ecosistemas acuáticos y terrestres y de sus ecosistemas asociados, sin causar alteraciones sensibles en ellos, o para actividades que permitan la reproducción, supervivencia, crecimiento, extracción y aprovechamiento de especies*

hidrobiológicas en cualquiera de sus formas, tal como en los casos de pesca y acuicultura".

7.4.2. **PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.**

Hay muchos factores abióticos que afectan los parámetros fisicoquímicos óptimos del medio donde se desarrolla este helecho acuático, como la temperatura, los macronutrientes y los micronutrientes.

A continuación se muestra una tabla resumen de diferentes parámetros fisicoquímicos que según la literatura consultada propician las condiciones para que se den los afloramientos de *Azolla sp*. La relación de algunos de los parámetros de discute seguidamante.

Parámetro	Unidades	Diciembre 2013	Abril 2014	Óptimos	Autores
Humedad relativa	%	62	74	70–75	Costa *et al.*, 1999, 2009; Biswas *et al.*, 2005)
Temperatura sitio de muestreo	°C	20	17	18 a 28°C 25-30	Debusk *et al.*, 1987; Sadeghi *et al.*, 2013ª
Turbiedad	UNT	1,18	41,05	0.74-125	Sadeghi *et al.*, 2012
pH	Unidades	7,10	6,95	5 - 7	Sadeghi *et al.*, 2013ª
Conductividad Específica	µmhos/cm 25ºC	189,7	203,5	**334- 14410**	Sadeghi *et al.*, 2012
Calcio	mg/L $CaCO_3$	25,5	40	9.62 - 240.48	Sadeghi *et al.*, 2012
Magnesio	mg/L $CaCO_3$	43,5	22,08	=0,24	Singh *et al.*, 2010
Hierro	mg/L Fe^{+3}	0.1	0.3	=0,05	Wagner ,1997
Manganeso	mg/L	<0,05	0,47	4.86 - 221.75	Sadeghi *et al.*, 2012
Amonio	mg/L NH_4^+	0,18	0,11	0.03 -3.93	Sadeghi *et al.*, 2012
Nitritos	mg/L $-NO_2^-$	<0,1	<0,1	0.00-0.20	Sadeghi *et al.*, 2012
Nitratos	mg/L $-NO_3^-$	<0,1	<0,1	0.00-1.04	Sadeghi *et al.*, 2012
Ortofosfatos	mg/L PO_4^{-3}	<0,2	<0,2	0.06	Sadeghi *et al.*, 2013 b
Sólidos totales	mg/L	184	863	279- 4388	Sadeghi *et al.*, 2012
Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO_5)	mg/L 0_2	7,00	11,5	2.00-16	Sadeghi *et al.*, 2012
Demanda Química de oxígeno (DQO)	mg/L 0_2	36,5	7	13- 98	Sadeghi *et al.*, 2012

El promedio obtenido de la temperatura del agua, durante el muestreo de diciembre fue de 20 y 17°C para abril. El rango óptimo para el crecimiento de *Azolla*, varía de 18 a 28°C. Sin embargo, para *Azolla filiculoides* se han observado óptimos entre 25-30°C y en otros experimentos, la densidad máxima de plantas fue observada entre 15-20°C (Debusk *et al.,* 1987; Sadeghi *et al.,* 2013a).

Sadeghi y cols. (2013a), reportan que un pH de 5 y un alta intensidad lumínica incrementa el crecimiento de *Azolla*. Mientras que pH de 6 -7 y alta intensidad

lumínica, pueden afectar la fijación de nitrógeno; asímismo afirman que la baja intensidad lumínica o sombra influye positivamente el crecimiento. En el humedal *Carabal*o, en la recolección del material, se pudo constar que el afloramiento de *Azolla*, se observó tanto en sombra como en la luz.

Micronutrientes como manganeso y hierro, son necesarios para el óptimo crecimiento de *Azolla*. En las muestras del humedal fueron encontrados valores de <0,05 a 0,78 mg/L Mn^{+7} y <0,1- 0,6 mg/L Fe^{+3}. Singh *et al.,* (2010) reportan que estos elementos en concentración de 0–0.01 mM aumentaron la actividad de una enzima que hace parte de la respuesta fisiológica adaptativa a la sal y otros mecanismos que median el estrés en la inhibición de la maquinaria fotosintética y también en la regulación de los desequilibrios de nutrientes durante proceso de adaptación a condiciones de elevada salinidad en contacto con tierras agrícolas muy contaminadas.

Wagner (1997) reporta que para el crecimiento de *Azolla* son suficientes 50 µg /L de hierro. Jain *et al*., (1992) observaron que cuando no hay biodisponibilidad de hierro, la planta se torna amarilla. En la recolección de *Azolla* del humedal, se dio cuenta de colores naranja, estos parecen obedecer al patrón natural de coloración que presenta el helecho y no a un déficit de este elemento.

Los macronutrientes como manganeso (<0,05 < 0,05mg/L $CaCO_3$) y calcio (0,16-0.78 mg/L $CaCO_3$) son base para el rápido crecimiento de *Azolla* (Sadeghi *et al*., 2012). El magnesio, un componente básico de las clorofilas, es un importante factor para la fotoforilación, fijación fotosintética de dióxido de carbono, además interviene en la síntesis de proteínas, la asimilación de los productos de la fotosíntesis y generación de formas reactivas de oxígeno. En los análisis se presenta con la mayor concentración comparado con otros nutrientes, la biodisponibilidad del magnesio beneficia el metabolismo de la planta, pues la enzima ribulosa-1.5- bifostato carboxilasa, fundamental en la fotosíntesis es activada por el Mg (Cakmak & Yazici, 2010).

El fósforo, representado en ortofosfatos, presentó en diciembre y abril una concentración <0,2 mg/L PO_4^{-3}. Este elemento es vital para el desarrollo de *Azolla,* la concentración óptima, en experimentos llevados a cabo por Sadeghi *et al*., (2013b) se encontró en 0.06 mg/L. Aunque la concentración reportada por el presente estudio es superior a la informada por Sadeghi *et al*., (2013 b), dado el afloramiento de *Azolla,* probablemente este macronutriente se encuentre en una concentración óptima, pero el límite de detección del instrumental permitió expresar como mínima concentración <0,2 mg/L PO_4^{-3}.

Las condiciones fisicoquímicas actuales del humedal pueden proporcionar un ambiente cercano al óptimo para que este helecho acuático se desarrolle.

7.4.3. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y SU VARIACIÓN DE ACUERDO CON LA NUEVA DINÁMICA DEL HUMEDAL

En la siguiente tabla se presenta una comparación de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en la presente investigación, realizados por el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, correspondientes a los muestreos del mes de diciembre del 2013, con los valores reportados por el Laboratorio Ambiental de la Corporación Regional de Valle del Cauca, en los meses de noviembre del 2006.

Para esta comparación se tuvieron en consideración parámetros como color, turbiedad, sólidos totales, conductividad, nitritos, nitratos, DBO_5 y DQO, por su importancia en la calidad de agua, para consumo humano y otros usos como el pecuario (Decreto 1594 de 1984 y Decreto 1575 de 2007).

Parámetro	Unidades	Diciembre 2013	Enero 2006 CVC
Temperatura sitio de muestreo	°C	20	–
Turbiedad	UNT	1,18	13.33
Color verdadero	UPC	150	81.87
pH	Unidades	7,10	6,64
Conductividad Específica	µmhos/cm 25°C	189,7	158,40
Alcalinidad total	mg/L $CaCO_3$	100,5	70,50
Calcio	mg/L $CaCO_3$	25,5	15,00
Magnesio	mg/L $CaCO_3$	43,5	7,20
Hierro	mg/L Fe^{+2}	0.1	
Manganeso	mg/L	<0,05	
Amonio	mg/L NH_4^+	0,18	0,76
Nitritos	mg/L $-NO_2^-$	<0,1	
Nitratos	mg/L $-NO_3^-$	<0,1	
Ortofosfatos	mg/L PO_4^{-3}	<0,2	0,07
Sólidos totales	mg/L	184	148,00
Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO_5)	mg/L O_2	7,00	4,29
Demanda Química de oxígeno (DQO)	mg/L O_2	36,5	23,13

La **turbiedad** para el 2006 se registró en 13. 33 UNT, mientras que para el 2012 se observaron 85 UNT y 41.05 UNT para 2013. Igualmente los **sólidos totales** del 2006 se presentaron en 148 mg/L, aumentando su concentración en el 2012 y 2013 en más de 40 mg/L. **El color**, para 2013 alcanzó las 150 UPC, con respecto a las 81.87 UPC reportadas para 2006. La **conductividad específica** se registró

en 178.67 µmhos/cm y 189.7 en 2011 y 2013 respectivamente, a comparación de 158.4 µmhos/cm en 2006. En los **nitritos** las concentraciones fueron menores a 0,1 mg/L -NO_2 en 2013, de 0.0018 mg/L -NO_2 en 2011 y menores a 0,003 mg/L -NO^2 para 2006. Los **nitratos,** menor a 0.114 mg/L -NO_3^- en 2011 y menor a 0,1 mg/L -NO_3^- en el año 2013, en contraste con las concentraciones inferiores a 0.4 mg/L -NO_3^- presentadas en 2006. La **DBO_5**, no arrojó mucha diferencia entre los años 2006 y 2011, 4.29 y 3.54 mg/L 0_2, respectivamente, mientras que para 2013 aumentó a 7 mg/L 0_2. La **DQO** disminuyó del 2006 al 2011 (23.13 a 13.63 mg/L 0_2) pero aumentó considerablemente en el año 2013 (36.5 mg/L 0_2)

El incremento en la concentración de los parámetros, color, turbiedad, sólidos totales, conductividad específica, DBO_5 y DQO, puede indicar que probablemente la falta de entrada de agua al humedal por parte del río Cauca, la desecación del mismo, aunado al afloramiento de este helecho, constituyen una de las principales causas del continuo deterioro de la calidad del agua del humedal *Carabalo*.

7.5. AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN *Azolla* aff*. filiculoides* Lam.

El material vegetal colectado en diciembre 2013 y abril 2014 se sometió a extracción con disolventes de polaridad ascendente. En la tabla 14, se reportan los rendimientos obtenidos para cada extracto de las dos muestras.

El extracto que obtuvo mayor rendimiento en ambas muestras fue el metanólico, lo que implicaría que la mayoría de los metabolitos secundarios presentes en *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, corresponderían a compuestos polares.

El rendimiento de todos los extractos fue menor al 3%, lo cual podría ser explicado dado la pérdida por secado del material vegetal que estuvo entre el 91.3 - 91.6%. Coherente con el planteamiento anterior el rendimiento del extracto de éter de petróleo es muy bajo al tratarse de un helecho acuático.

Tabla 14. Extracción de *Azolla* aff*. filiculoides* Lam.

Material vegetal Peso seco (g)		Extracto	Peso seco de extracto (g)		Rendimiento (%)	
M1*	**M2****		**M1***	**M2****	**M1***	**M2****
500	500	Éter de petróleo	0,664	1,102	0,13	0,22
499.3	498.9	Clorofórmico	5.243	5,842	1,05	1,17
494	493,1	Metanólico	9,324	11,688	1,88	2,37
484.8	481,4	Acuoso	6,669	5,749	1.38	1,19

* Muestra 1 (diciembre 2013)
** Muestra 2 (abril 2014)

Los mayores rendimientos se presentaron con las muestras colectadas en el mes de abril, excepto para los extractos acuosos, donde fue menor. De acuerdo con los rendimientos obtenidos, en estas dos épocas del año, podría deberse a los cambios en las condiciones geoclimáticas, las cuales pueden afectar la biosíntesis de los metabolitos secundarios.

Los resultados de la determinación colorimétrica de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Pruebas colorimétricas de los extractos *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.

Metabolito secundario	Prueba	Muestras	EXTRACTOS			
			Éter de Petróleo	**Cloroformo**	**Metanol**	**Agua**
Alcaloides	Dragendorff	**M1* M2****	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
	Mayer	**M1* M2****	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
	Valser	**M1* M2****	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
	Reineckato	**M1* M2****	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
Flavonoides	Cianidina	**M1* M2****	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa
Taninos	$FeCl_3$	**M1* M2****	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva

		Gelatina-sal	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
Saponinas		Espuma	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva

* Muestra 1 (diciembre 2013)
** Muestra 2 (abril 2014)

Los resultados obtenidos para los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam*,* identifican la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas.

El hallazgo de este tipo de metabolitos es consistente con lo reportado por Texeira *et al.,* 2001 en *Azolla filiculoides* (saponinas); Pereira & Carrapiço (2007), encontraron, dentro de las cavidades foliares del helecho acuático la presencia de alcaloides y taninos; Masood *et al.,* en el 2008 reportan flavonoides en *Azolla filiculoides*.

Los resultados de la cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos (condiciones y Rfs) se consignan en la tabla 16, utilizando como fase estacionaria (gel de sílice GF_{254}) y como agente cromogénico diferentes reveladores.

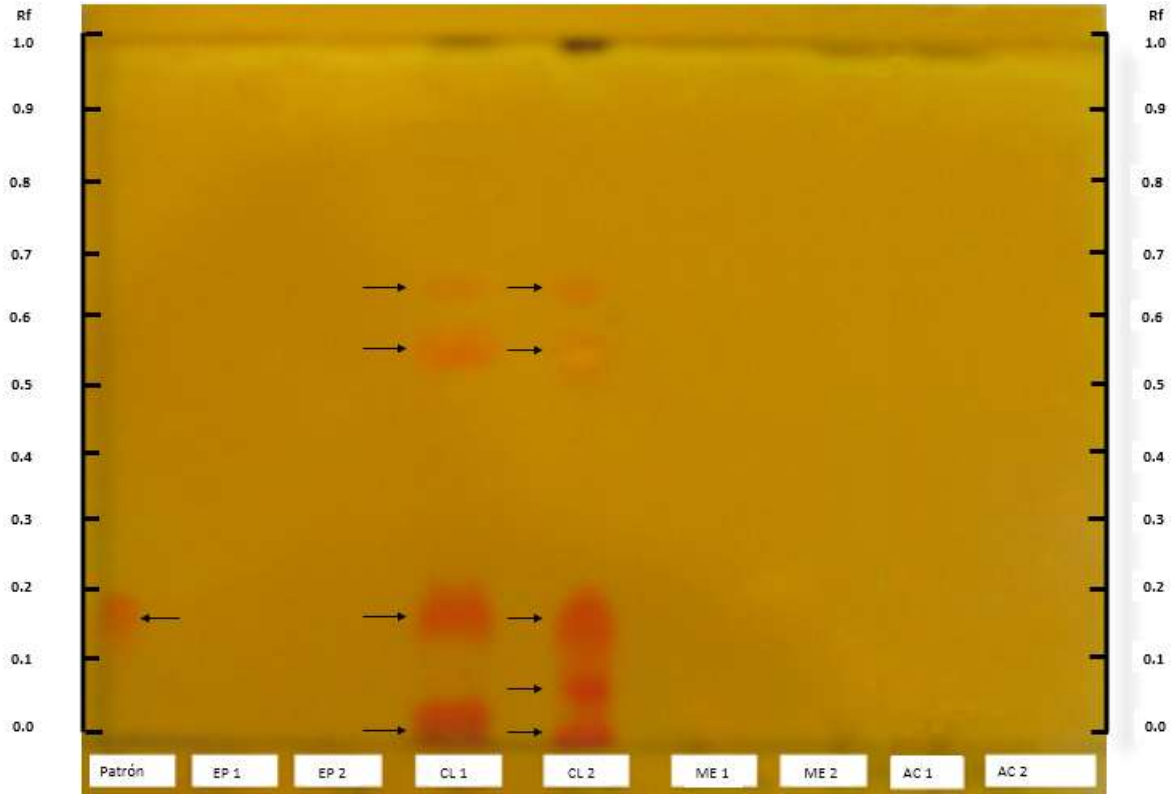
Tabla 16. Rfs de los extractos de *Azolla* aff.*filiculoides* Lam.

Alcaloides	***Rf (cm)***
Patrón: Escopolamina	0.18
Éter de petróleo (diciembre)	Negativo
Éter de petróleo (abril)	Negativo
Cloroformo (diciembre)	0,06; 0,17; 0,53, 0,65
Cloroformo (abril)	0,06; 0,15 0,17; 0,53, 0,65
Metanol (diciembre)	Negativo
Metanol (abril)	Negativo
Acuoso (diciembre)	Negativo
Acuoso (abril)	Negativo
Flavonoides	
Patrón: Rutina	0.85
Éter de petróleo (diciembre)	Negativo
Éter de petróleo (abril)	Negativo
Cloroformo (diciembre)	0,06; 0,6; 0,8; 0,82.
Cloroformo (abril)	0,06; 0,79; 0;83
Metanol (diciembre)	Negativo
Metanol (abril)	Negativo
Acuoso (diciembre)	Negativo
Acuoso (abril)	Negativo

Saponinas	
Patrón: Diosgenina	0,075; 0,19
Éter de petróleo (diciembre)	Negativo
Éter de petróleo (abril)	Negativo
Cloroformo (diciembre)	Negativo
Cloroformo (abril)	Negativo
Metanol (diciembre)	0,52; 0,67; 0,75
Metanol (abril)	0,48; 0,6; 0,75
Acuoso (diciembre)	0,46; 0,8; 0,9
Acuoso (abril)	0,52; 0,8; 0,89
Taninos	
Patrón: Ácido gálico	0,28
Éter de petróleo (diciembre)	Negativo
Éter de petróleo (abril)	Negativo
Cloroformo (diciembre)	Negativo
Cloroformo (abril)	Negativo
Metanol (diciembre)	0,34;0,42;0,49;0,54
Metanol (abril)	0,35;0,41,0,49
Acuoso (diciembre)	0,86
Acuoso (abril)	0.84

En las figuras, 14, 15, 16 y 18 se presentan los cromatogramas obtenidos al eluir los extractos y patrones, utilizando sistemas eluyentes y agentes cromogénicos específicos para evidenciar la presencia de alcaloides, flavoniodes, taninos y saponinas.

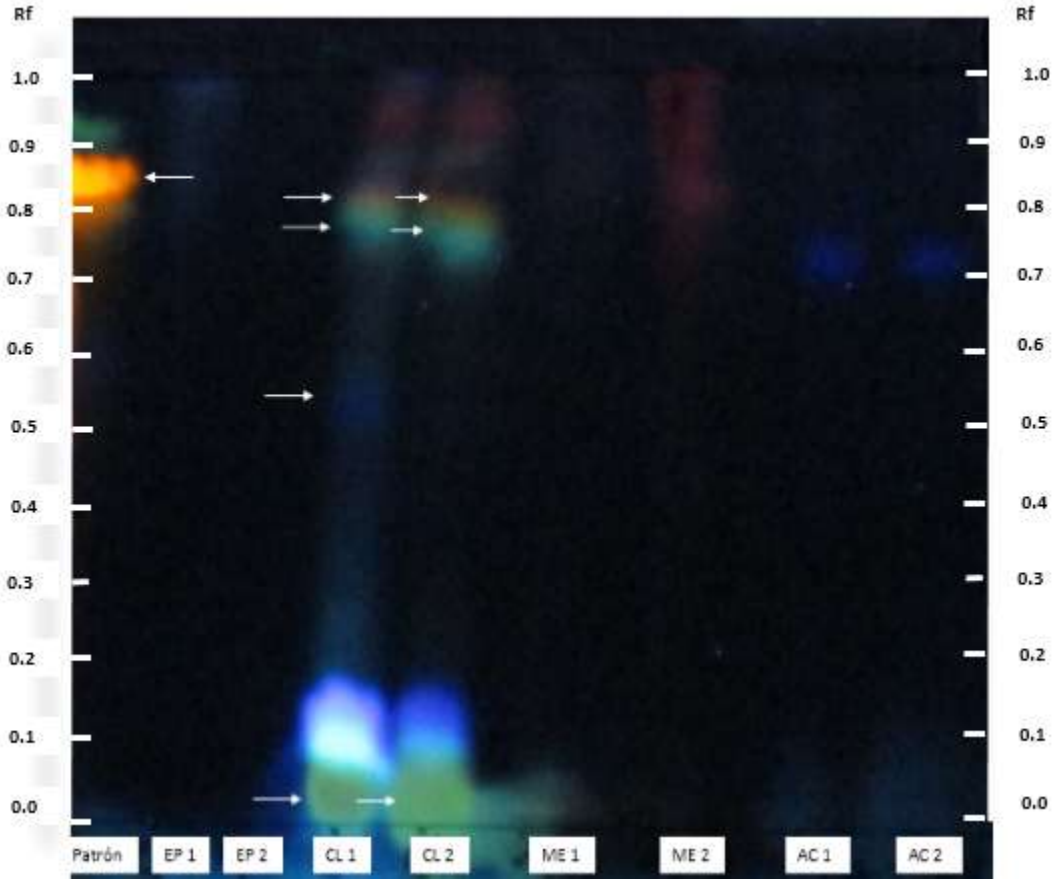
Figura 14. Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff*. filiculoides* Lam (alcaloides)



Nota: patrón (escopolamina); EP1 (extracto de éter de petróleo-diciembre); EP2 (extracto de éter de petróleo-abril); CL1 (extracto clorofórmico-diciembre); CL2 (extracto clorofórmico-abril; AC1(extracto acuoso-diciembre); AC2 (extracto acuoso-abril).

La CCD de los extractos clorofórmicos, (figura 14), al ser revelada con Dragendorff, presenta 5 bandas (señaladas con flechas) para el extracto coloformico de abril, con Rfs de 0,06; 0,15 0,17; 0,53, 0,65 lo que corresponde probablemente a cinco alcaloides. No se evidenció la presencia de alcaloides en los extractos de éter de petróleo, metanólicos y acuosos.

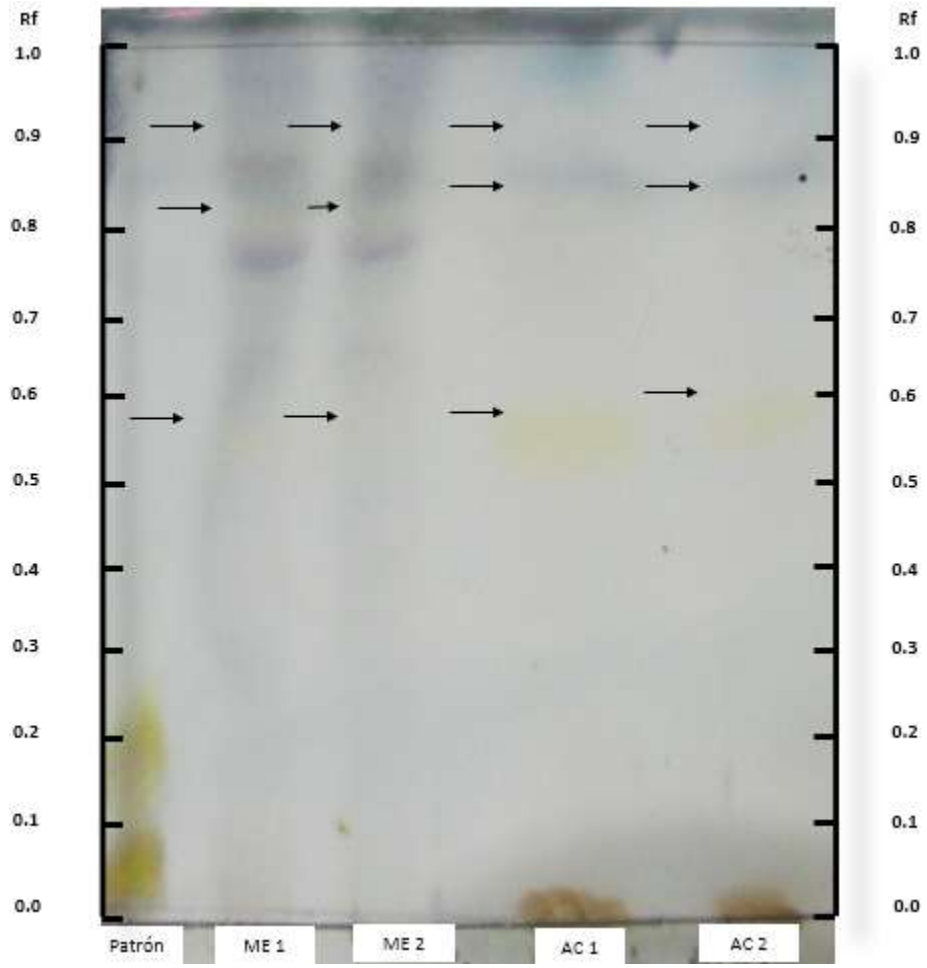
Figura 15. Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam (flavonoides)



Nota: patrón (rutina); EP1 (extracto de éter de petróleo-diciembre); EP2 (extracto de éter de petróleo-abril); CL1(extracto clorofórmico-diciembre); CL2 (extracto clorofórmico-abril); ME1 (extracto metanólico –diciembre); ME2 (extracto metanólico –abril); AC1(extracto acuoso-diciembre); AC2 (extracto acuoso-abril)

Para poner de manifiesto la presencia de flavoniodes se utilizaron como agentes reveladores (utilizando su carácter fenólico y la presencia de sistemas aromáticos conjugados que le proporcionan una intensa absorción en la región ultravioleta) NP-PEG, luz UV 365 nm. Las bandas obtenidas (amarillos, verdes y azules fluorescentes) se señalan con flechas en el cromatograma (figura 15). Se pudo determinar la presencia de flavonoides en los dos extractos clorofórmicos.

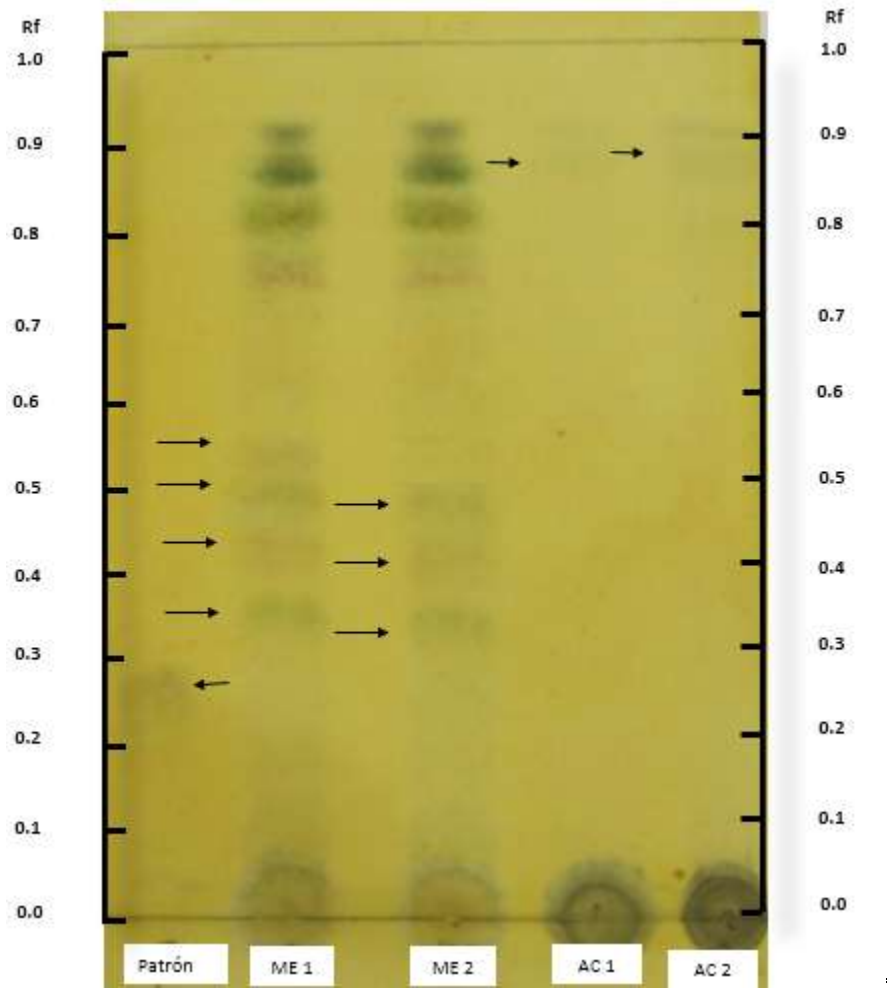
Figura 16. Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff*. filiculoides* Lam (saponinas).



Nota: patrón (diosgenina); ME1 (extracto metanólico–diciembre); ME2 (extracto metanólico –abril); AC1(extracto acuoso-diciembre); AC2 (extracto acuoso-abril)

Se detectó la presencia de metabolitos pertenecientes al grupo de los triterpenos, Después de asperjar con la solución 1 (Vainillina al 1% en etanol) y 2 (Ácido sulfúrico en etanol al 5 %) y calentar a 100°C por 5 min. El patrón positivo (diosgenina), reveló amarillo-café, al igual que las bandas que se presentaron en los extractos metanólicos y acuosos (señaladas con flechas). En el cromatograma, se observaron igual número de bandas para estos extractos.

Figura18. Cromatograma de los extractos de *Azolla* aff*. filiculoides* Lam (taninos)



Nota: patrón (ácido gálico); ME1 (extracto metanólico–diciembre); ME2 (extracto metanólico –abril); AC1(extracto acuoso-diciembre); AC2 (extracto acuoso-abril)

Los taninos, se evidenciaron en los extractos metanólico y acuoso. Al aplicar el revelador cloruro férrico, las muestras que contienen taninos se tornan negras, azules, pardas (Sanabria, 1983).

Con el análisis de los resultados de la CCD de los extractos de *Azolla* aff*. filiculoides* Lam se concluye que se encuentran presentes los siguientes tipos de metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos.

Específicamente alcaloides y flavonoides se evidenciaron en los extractos clorofórmicos y los taninos y las saponinas se observaron tanto en los extractos metanólicos como en los acuosos. Los resultados de las pruebas colorimétricas son consistentes con los obtenidos por CCD.

Los extractos de *Azolla* aff*. filiculoides* Lam, procedentes de los dos muestreos (diciembre 2013 y abril 2014), presentan un comportamiento cromatográfico similar en los sistemas eluyentes y agentes cromogénicos utilizados. Las diferencias observadas entre los muestreos probablemente obedecen a los cambios en las condiciones geoclimáticas, lo cual puede resultar en un aumento de un metabolito específico, como en el caso de los alcaloides, en donde se notó una mancha más para el mes de abril.

Azolla sp. presenta un endosimbionte fijador de nitrógeno, es posible que sintetizará una mayor cantidad de alcaloides para ser utilizados como reservorio de nitrógeno en época de sequia. Algunos autores (Soeder, 1985; Anaya, 2003; Salminen *et al.,* 2004; Carrapiço, 2010; Wang *et al.,* 2011 y Castro-Moreno *et al.,* 2013), reportan que los alcaloides sirven como almacenadores de ciertos elementos (nitrógeno y carbono), pues en su mayoría son sintetizados, a partir de aminoácidos que, más tarde, pueden ser reciclados dentro de las vías metabólicas primarias.

El extracto metanólico de la muestra de diciembre, presentó un mayor número de bandas en el cromatograma para taninos. De acuerdo con lo reportado por Romero *et al.,* (2000) los taninos unidos a proteínas constituyen alrededor del 70%-75% de los taninos condensados totales, los cuales son más abundantes en la época de sequía que en época de lluvias. Salminen *et al.,* (2004) e Isaza (2007) publicaron que los polifenoles suelen incrementarse en situaciones de estrés y el alto contenido de polifenoles puede atribuirse a las altas temperaturas. García *et al.,* (2010), manifiesta que dentro de los diversos factores que afectan la biosíntesis de estos metabolitos secundarios, se destacan la cantidad de agua y la

temperatura ambiental, la cual fue mayor en el mes de diciembre que en abril (29 y 24 °C, respectivamente).

7.6. ENSAYOS TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna* COMO ORGANISMO DE PRUEBA

7.6.1. ENSAYOS TOXICIDAD AGUA HUMEDAL *CARABALO*

Los resultados obtenidos para este ensayo de toxicidad aguda de las muestras de agua del humedal Carabalo, se consignan en la tabla 17.

Tabla 17. Ensayos preliminares de toxicidad de las muestras de agua del Humedal *Carabalo* Punto 1 y 2 muestreos Diciembre 2013 – Abril 2014, *D. magna*

Muestreos	**Punto**	**Concentración H_20 (V/V %)**	**Total No de Organismos inmovilizados o muertos (48 horas)**
Diciembre 2013	1	100	1/15
	2	-	-
		Control negativo	0/15
Abril 2014	3	100	2/15
	4	-	-
		Control negativo	1/15

- No se presentó efecto tóxico a ninguna concentración.

Como se puede observar en todas las concentraciones utilizadas, no mostraron efectos tóxicos (mortalidad, variación en el tamaño, alteración en el patrón de nado) en los organismos de prueba. De hecho, los cladóceros presentaron un comportamiento similar al control negativo. (Datos completos se muestran en el Anexo E).

7.6.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD EXTRACTOS DE *Azolla* aff*. filiculoides* Lam.

Pruebas preliminares

Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam utilizando como organismo de prueba *D. magna* permitieron evidenciar que ninguno de los cuatro extractos, presentó un efecto letal sobre los cladóceros a la máxima concentración utilizada de 1000 ppm (Datos completos Anexo F).

Sin embargo para los extractos metanólico y acuoso se observó un cambio drástico en el patrón de nado, al presentar un movimiento vibratorio y un aumento en la velocidad de nado, a concentraciones de 500 ppm y 1000 para los extractos metanólicos y acuosos respectivamente. Adicionalmente para ambos extractos se observó pérdida acelerada de los caparazones debido, probablemente, a la presencia de taninos que se asocian con macromoléculas (como la quitina compuesto esencial del caparazón de la *Daphnias*) (Rámirez & Yánez,1996)**.**

En los extractos clorofórmicos (1000-500 ppm), el patrón de nado cambio, observándose una disminución en la velocidad de nado con respecto a su patrón normal, este efecto se puede deber a la presencia de alcaloides en este extracto.

Ensayos definitivos

Los extractos clorofórmicos presentaron el efecto de alteración en el patrón de nado a concentraciones de 350 ppm, mientras que para los extractos metanólicos fue de 300 ppm**;** los extractos acuosos presentaron el mismo efecto a la concentración de 800 ppm.

7.7. ENSAYOS TOXICIDAD AGUDA CON *Hydra attenuata*

7.7.1. ENSAYOS TOXICIDAD DEL AGUA (HUMEDAL *CARABALO*)

Los resultados de los ensayos se consignan en el Anexo G y no se evidenció letalidad en *Hydra attenuata, a* las concentraciones utilizadas.

7.7.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam

Ensayos preliminares

Los extractos evaluados no presentaron letalidad a la máxima concentración utilizada en el bioensayo (1000 ppm). Sin embargo, sí fue posible evidenciar efectos subletales (tentáculos, cortos y globosos) para los extractos clorofórmico ($CE_{50\text{-}72}$ = 500 ppm) y metanólico ($CE_{50\text{-}72}$ = 500 ppm). Los extractos de éter de petróleo y agua, no presentaron efectos letales, ni subletales a la máxima concentración utilizada en este organismo (1000 ppm) (los datos se consignan en el Anexo H).

Ensayos definitivos

En los ensayos definitivos, los extractos tanto clorofórmico como metanólico presentaron efectos subletales (tentáculos cortos y globosos) a la concentración de 300 ppm. Los datos se muestran en el Anexo I.

7.8. FRACCIONAMIENTO, AISLAMIENTO BIOGUIADO

Tomando en consideración los resultados obtenidos tanto en las caracterizaciones colorimétricas y cromatográficas, así como en los ensayos de toxicidad definitivos de los extractos de *Azolla* aff. *filiculoides*, Lam. se procedió a obtener la fracción enriquecida de alcaloides a partir de los extractos clorofórmicos, utilizando una extracción ácido-base. El redimiento de las fracciones se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Rendimiento fracciones enriquecidas en alcaloides de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.

Extracto clorórmico Peso seco (g)		Peso seco de fracción alcaloidal (g)		Rendimiento (%)	
M1	**M2**	**M1***	**M2****	**M1***	**M2****
2	2	0,067	0.063	3.35	3.15

* Muestra 1 (diciembre 2013)
** Muestra 2 (abril 2014)

Los ensayos de toxicidad, para estas fracciones se realizaron utilizando como organismo de prueba *Daphnia magna*.

El análisis de los resultados obtenidos indica que la fracción procedente del muestreo de diciembre (2013) presenta una alteración en el patrón de nado de los organismos a una concentración de 500 ppm, en tanto que la fracción alcaloidal del muestreo de abril (2014) mostró ser más tóxica ya que generó alteración en el patrón de nado a una concentración de 438 ppm (Los datos obtenidos se muestran en el Anexo J).

En cuanto a la CL_{50} que presentaron estas dos fracciones alcaloidales, los resultados son consistentes con lo observado en la alteración del patrón de nado ya que para la fracción del muestreo de abril se obtuvo una CL_{50} de 357 ppm mientras que para la de diciembre fue de 572 ppm. (Datos en en Anexo J)

Una posible explicación a estos resultados podría atribuirse a que en la caracterización por CCD se visualiza un mayor número de bandas en el extracto clorofórmico obtenido del muestreo de abril 2014, que en el de diciembre 2013, al revelar con el reactivo de Dragendorff.

A continuación se resumen los resultados obtenidos en la siguiente tabla

		Daphnia magna		*Hydra attenuata*	
Carta de sensibilidad		CL_{50-24} =1.1 ppm ISO 6341:2012 (0,6 -2.1 ppm)		CL_{50-72}=0.77 ppm Brugés, 2006 (0,57-1,62 ppm)	
Agua humedal		No presentó letalidad (100%)		No presentó letalidad (100%)	
Extractos de *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.	Efecto letal	Éter de petróleo	CL_{50-48} >1000 ppm	Éter de petróleo	CL_{50-72} >1000 ppm
		Clorofórmico		Clorofórmico	
		Metanólico		Metanólico	
		Acuoso		Acuoso	
	Efecto subletal	Éter de petróleo	>1000 ppm	Éter de petróleo	>1000 ppm
		Clorofórmico	>350 ppm	Clorofórmico	>300 ppm
		Metanólico	>300 ppm	Metanólico	>300 ppm
		Acuoso	>800 ppm	Acuoso	>1000 ppm

8. CONCLUSIONES

- La clasificación taxonómica de *Azolla* en estudio es: *Azolla* aff. *filiculoides* Lam.
- De acuerdo con la normativa vigente en Colombia y tomando en consideración la caracterización fisicoquímica de las muestras de agua del humedal *Carabalo,* no se recomienda para consumo humano, ni para recreativo o pecuario, exclusivamente se recomienda su uso para preservación de flora y fauna.
- Las condiciones fisicoquímicas actuales del humedal probablemente están incidiendo en los afloramientos de *Azolla* aff. *filiculoides,* ya que varios parámetros se encuentran dentro del rango óptimo reportado para su desarrollo.
- En comparación con el informe de la Corporación Regional del Valle del Cauca en 2006, *Carabalo* presenta un deterioro en la calidad de agua, posiblemente debido a la desecación del cuerpo de agua, aunado al afloramiento de esta macrófita.

- Los estudios fitoquímicos que se realizaron a *Azolla* aff. *filiculoides*, mostraron la presencia de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas.
- Los bioensayos de toxicidad realizados con el agua del humedal, no evidenciaron toxicidad, con los organismos de prueba utilizados .
- La evaluación de los cuatro extractos obtenidos en *Daphnia magna*, mostró que los extractos metanólicos, clorofórmicos y acuosos, producen una alteración en el patrón de nado de este cladócero.
- En los bioensayos con *Hydra attenuata*, se evidenciaron efectos subletales como tentáculos cortos y globosos en los extractos clorofórmicos y metanólicos. Esto indica que los extractos presentan una toxicidad muy baja, según la clasificación de CYTED (1995).

9. RECOMENDACIONES

- Realizar bioensayos de toxicidad crónica, para el caso de *D. magna*, con el fin de corroborar que no existen efectos deletérios a largo plazo.
- Debido a que los compuestos solubles en agua pueden encontrarse en bajas concentraciones, se recomienda concentrar las muestras para realizar los ensayos de toxicidad.
- Dado que la fracción alcaloidal presente en *Azolla* mostró efectos tóxicos se recomienda hacer el aislamiento y elucidación estructural de los mismos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, G. 2013. Evaluation of antimicrobial activity of methanolic extracts of the aquatic pteridophyte *Azolla microphylla*. Vegetos 26:200-204.

Abraham, G. & Vidhu, A. 2012. A preliminary examination of the phytochemical profile of *Azolla microphylla* with respect to Seasons. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. S1392-S1395.

Anaya, A. 2003, Ecología química. Ed Plaza y Valdés. México D.F. 343 pag.

Barrón–Yánez, M., García–Mateos, M., Soto–Hernández, R., Colinas–León, T. & Kite, G. 2011. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. Revista Fitotecnia Mexicana. 34(3): 151-157.

Boets, P., Lock, K., Cammaerts, R., Plu, D.& Goethals, P. 2009. Occurrence of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Belgium (Crustacea: Cambaridae). Belgian Journal of Zoology. 139: 173–176**.**

Brugés, K., Y. 2006. Evaluación prelimiar detoxicidad, genotoxicidad, y actividad antimicrobiana de *sida rhombifolia L.* proveniente de la Sierra Nevada de Santa Marta. Trabajo de grado, Maestría en Microbiología. Facultad de Ciencias.. Universidad Nacional de Colombia. 171 páginas.

Camak, I. & Yazici A.M. 2010. Magnesium: a forgotten Element in Crop Production. Beteer Crops 94 (2): 23-25.

Carrapiço, F. 2010. *Azolla* as a Superorganism: Its Implication in Symbiotic Studies. *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology,* Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology 17: 225–241.

Castillo, G. (ed). 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo CIID (IDRC), Instituto Mexicano de Tecnología del Agua IMTA. México, DF. Pags. 52-71

Castro, S. 2004. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Insertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Trabajo de grado, pregrado en biología Pontificia Universidad Javeriana. 68 páginas.

Castro, R., Novo, R. & Castro, R. 2003. Influence of A*zolla-anabaena* symbiosis on rice (*Oryza sativaL*) crop as a nutritional alternative. Cultivos Tropicales 24(3): 77-82.

Castro-Moreno, M., Tinoco-Ojangurén, C., Cruz-Ortega, M. & González-Esquinca. A. 2013. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (*Annonaceae*). Journal of Plant Research. 126(4): 529-537

CVC. Corporación Regional Autónoma del Valle del Cauca. 2006. Orden de trabajo 1297 de 2005. Formulación del plan de manejo ambiental del humedal el Avispal o Carablo Corregimiento de Quinamayó, Municipio de Jamundí. 119 pág.

CVC.Corporación Regional Autónoma del Valle del Cauca. 2012. HUMEDAL AVISPAL(CARABALO). http://www.cvc.gov.co/portal/index.php/es/tematicas/biodiversidad/humedales/humedales-lenticos-rio-cauca/217-biodiversidad/humedales/humedales-lenticos-sist-rio-cauca/84-humedal-avispal-carabalo. Consultado: julio del 2013.

Debusk, W.. & K Reddy. 1987. Growth and Nutrient Uptake Potential of *A. caroliniana* Willd. and *Salvinia-Rotundifolia* Willd. as a function of temperature. Environmental and Experimental Botany. 27: 215-22.

DECRETO 1594 de 1984, por el cual se reglamenta parcialmente el Título I de la Ley 09 de 1979, así como el Capítulo II del Título VI - Parte III - Libro II y el Título III de la Parte III Libro I del Decreto 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos**.** http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18617

DECRETO 1575 DE 2007, por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano. http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=30007. Consultado en 16 de noviembre del 2014.

Díaz-Báez, MC., Bustos López, MC., Espinosa Ramírez AJ. 2004. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Colección de Textos. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá pág. 64- 66.

EPA. United States Environmental Protection Agency. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. Cincinnati, Ohio. pp 117-166.

García, M., García, G., & Sanabria, M. 2010 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento, daño oxidativo y concentración foliar de metabolitos secundarios en dos variedades de Caraota (*Phaseolus vulgaris*). Revista Interciencia Caracas (Venezuela). 35(11): 840-846.

Hernández, J.& Luengas, P. 2013. Preliminary phytochemical study of *Cecropia membranacea* Trécul. and *Cecropia metensis Cuatrec*. Revista cubana de plantas medicinales. 8(4).

Hove, C. & Lejeune, A. 2009. The *Azolla–Anabaena* Symbiosis. Biology and Environment: Proceedings Of The Royal Irish Academy. 102B (1): 23–26.

Isajar, Mary Luz., Isajar Wimer Fernando. 2013. Comunicación personal. Licenciados en Ciencias Naturales, profesionales de la Institución Sixto María Rojas. Quinmayó (Municipio de Jamundí) Valle del Cauca. Octubre del 2013.

Isaza, M**.** 2007. Taninos o Polifenoles Vegetales. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. Scientia et Technica. Año XIII (33):13-18**.**

ISO 6341. 2012. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test.

Iwashina, T., Kitajima, J., Matsumoto, S. 2010. Luteolinidin 5-O-glucoside from *Azolla* as a Stable Taxonomic Marker. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B. 36(2): 61–64.

Jain, S.K., Gujral, G.S., Jha N.K. & Vasudevan, P. 1992. Production of biogas from *Azolla pinnata* R. Br and *Lemna minor* L.: Effect of heavy metal contamination. Bioresource Technology . 41: 273–277.

Kösesakal, T. 2014. Effects of Seasonal Changes on Pigment Composition of *Azolla filiculoides* Lam. American Fern Journal 104(2):58-66.

Lechno-Yossef, S. & Nierzwicki-Bauer, SA. 2003. Chap. 9: *Azolla-Anabaena* Symbiosis pág. 156. En Rai, AN., Bergman, B & Rasmussen U. (eds.) *Cyanobacteria* in Symbiosis. Kluwer Academic Publishers. Netherlans. 2003. Pags. 153-178.

Leterme, P., Londoño, AM., Ordoñez, DC., Rosales, A., Estrada, F, Bindelle, J., Buldgen, A. 2009. Nutritional value and intake of aquatic ferns (*Azolla filiculoides* Lam. and *Salvinia molesta* Mitchell.) in sows. Animal Feed Science and Technology 155: 55–64.

López, R., Silva, R. & Ruiz, S. 2003. Aislamiento de Esteroles, Bases de Amonio y Saponinas de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gillies ex Hicken *(Amaranthaceae).*Acta Farmacéutica Bonaerense. 22 (2): 101-4.

Lumpkin, TA. & Plucknett, DL.1980. *Azolla*: Botany, physiology, and uses as a green manure. Economic Botany. 34:111–153. En: Wagner, GM. 1997. Azolla: A review of its biology and utilization. The Botanicals Reviews. 63(1): 1-26.

McInnis, R. 1989. *Daphnia magna*. Toxicity Test Procedures. National Water Research Institute. Environment Canadá**.**

Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V. 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. Environment International. 33(3): 414–425.

Masood A., Zeeshan M., & Abraham, G. 2008. Response of growth and antioxidant enzymes in *Azolla* plants (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*) exposed to UV-B. Acta Biologica Hungarica. 59: 247-258.

Mayer, F., Jr. & M. Ellersieck. 1986. Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. U.S. Deptarment of the Interior, Fish & Wildlife Service. Resource Publication. 160. 439 p.

Márquez C., & Guillot M. 2001. Ecología y efecto ambiental de embalses. Aproximación con casos colombianos. Facultad de Minas, Instituto de estudios ambientales. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 218 pp.

Montaño, M. 2013. Nitrógeno, *Azolla,* arroz, agricultura, salud, medio ambiente, economía, Ecosistema Guayas, conocimiento tropical: eslabones de la prosperidad del Ecuador. Focus edición 57. Documento electrónico. Disponible en http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24192/1/Nitr%C3%B3geno,%20Azolla.pdf. Consultado 18 de diciembre 2013.

Moore, AW. 1969. *Azolla*: Biology and Agronomic Significance. The Botanical Reviews. 35: 17-34.

Muraleedharannair, J., Johnson M., Mony, M., Zachariah, M. & Solomon. J. 2011. Phytochemical studies on *Azolla pinnata* R. Br., *Marsilea minuta* L. and *Salvinia molesta* Mitch. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. S26- S29.

Pereira, A. L. & F. Carrapiço (2007) Histochemistry of simple hairs from the foliar cavities of *Azolla filiculoides* , Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana, 141(3): 323-328.

Pereira, A., Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L. & Carrapiço F. 2009. Volatile compounds from the symbiotic system *Azolla filiculoides-Anabaena azollae* bacteria. Plant Biosystems. 143(2): 268–274.

Pereira, A., Madalena, M., Margarida Oliveira, M., & Carrapiço, F. 2011. Morphological and genetic diversity of the family Azollaceae inferred from vegetative characters and RAPD markers. Plant Systematics and Evolution. 297: 213–226.

Pereira, A., & Vasconcelos, V. 2014. Classification and phylogeny of the cyanobiont *Anabaena azollae* Strasburger: an answered question?. International Journal of

Systematic and Evolutionary Microbiology. Publicado en abril 15. doi:10.1099/ijs.0.059238-0.

Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, Cl. Moreira-Santos M., Vollat B., Törökne A., & Han T. 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. Aquatic Ecosystemic. 309: 01.

POLÍTICA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD REPÚBLICA DE COLOMBIA. 1996. MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN. INSTITUTO "ALEXANDER VON HUMBOLDT. Documento en línea disponible en http://www.minambiente.gov.co/documentos/politica_nacional-biodiversidad.pdf. Consultado el 18 de diciembre del 2013.

Popl, M., Fähnrich, J., Tatar V. 1990. *Chromatograpic Analysis of Alkaloids*. *Chromatographic Science*. Marcel Dekker New York. pp 154.

Pretti, C., Chiappe, C., Baldetti, I., Brunini, S., Monni, G., Intorre, L. 2009. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. Ecotoxicology and Environmental Safety .72: 1170–1176.

Quinn. B, Gagné F, Blaise C. 2008. The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. Science of the Total Environment. 402: 62– 69.

Quinn, B., Gagné F., Blaise C. 2012. *Hydra,* a model system for environmental studies. The International Journal of Developmental Biology. 56: 613-625.

RAS. REGLAMENTO TÉCNICO DEL SECTOR DE AGUA POTABLE Y SANEAMIENTO BÁSICO . 2000. Calidad de la Fuente. Título C, Sistemas de Potabilización, República de Colombia. pág C.20.

Roldán, P. &Ramírez, J., 2008. Fundamentos de limnología neotropical. Universidad de Antioquia, Medelín. 2da Ed. 440 P**.**

Romero, L., Palma, G. & López, J. 2000. Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. Livestock Research for Rural Development 4(12):1-9

Sadeghi, R., Zarkami, R., Sabetraftar, K. & Van Damme, P. 2012. Use of support vector machines (SVMs) to predict distribution of an invasive water fern *Azolla filiculoides* (Lam.) in Anzali wetland, southern Caspian Sea, Iran. Ecological Modelling. 244, 117–126.

Sadeghi, R., Zarkami R., Sabetraftar. K., & Van Damme. P. 2013 a. A review of some ecological factors affecting the growth of *Azolla spp.* Caspian Journal of Environmental Science. 11 (1): 65-76**.**

Sadeghi, R., Zarkami, R., Sabetraftar, K. & Van Damme, P. 2013 b. Application of genetic algorithm and greedy stepwise to select input variables in classification tree models for the prediction of habitat requirements of *Azolla filiculoides* (Lam.) in Anzali wetland, Iran. Ecological Modelling. 251: 44–53.

Salminen, J., Roslin, M., Karonen, J., Sinkkonen, K., Pihlaja & Pulkkinen. P. 2004. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. J Chem Ecology. 30(9):1693- 1711.

Sanabria, A., 1983. Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la Familia *Compositae*. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Pág 80-87.

Sánchez-Viveros, G., Ferrera-Cerrato, R. & Alarcón, A. 2011. Short-Term Effects of Arsenate-Induced Toxicity on Growth, Chlorophyll and Carotenoid Contents, and Total Content of Phenolic Compounds *of Azolla filiculoides*. Water, Air & Soil Pollution. 217: 455–462.

Sculthorpe, CD. 1967. The Biology of aquatic vascular plants. Edward. Arnold. Ed. London. 610 pp. En: Aragonés R. Fernández-Zamudio J. Bustamante P. García-Murillo, R. Díaz-Delgado, F, & Cirujano S. Teledetección: Agua y desarrollo sostenible. XIII Congreso de le Asociación Española de Teledetección. Calatayud, 23/26 de septiembre de 2009. pp 97-100.

Silva, J., Torrejón, G., Bay-Schmith, E. & Larrain A. 2003. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: cladocera) usando un tóxico de referencia. Gayana 67(1): 87-96.

Singh, S., Mishra, A. & Upadhyay, R. 2010. Potentiality of *Azolla* as a suitable P-biofertilizer under salinity through acid phosphatase activity. Ecological Engineering. 36, 1076-1082.

Smirnov, N. 2014. Physiology of the Cladocera. Elsevier. London 352 pag.

Soeder, R. 1985. Fern constituents: Including occurrence, chemotaxonomy and physiological activity. The Botanical Review. 4: 442-536.

Teixeira, G., Carrapiço, E & Gomes, E. 2001. C-Glycosilflavones in the genus *Azolla* Lam. Plant Biosyste Ms, 135 (2) 233-237.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. & Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. Internationale Pharmaceutica Sciencia. 1(1): 98-106.

Touchstone, J. & Dobbins,M. 1992. Practice of Thin Layer Chromatography. Willey – Interscience, New York. Pag 387

Trottier, S., C. Blaise, T. Kusui & Johnson E.M.. 1997. Acute toxicity Assessment of Aqueous Samples Using a Microplate-based *Hydra attenuata* Assay. Environmental Toxicology and Water Quality.12: 265-271

Valenzuela. AL. 2002. Evaluación preliminar y de la toxicidad aguda y subcrónica de extractos vegetales utilizando: *Daphnia magna* e *Hydra attenuata.* Tesis Químico Farmacéutico. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Vander Zanden, M.J. & Olden, J.D. 2008. A management framework for preventing the secondary spread of aquatic invasive species. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 65: 1512–1522.

Vanisree, M., Lee, C., Lo, S Manohar, S., Yih Lin, C, Tsay, C. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 45: 1-22.

Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews. 1(1):13-25

Villegas-Navarro, A., Rosas-L., Reyes, J. 2003. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 136:127–134

Wagner, G.M.1997. *Azolla:* A review of its biology and utilization. Botanicals Reviews. 63:1-26.

Wang, L.. Wei, K., Jiang, W., Cheng, H., Zhou, J., He, W. & . Zhang, C. 2011. Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.). European Food Research and Technology. 233: 1049–1055.

Waseem, R., Preeti, R., Suchit, AJ., & Pramood, WR. 2012. *Azolla*: An aquatic pteridophyte with great potencial. International Journal of Research in Biological Sciences. 2(2): 68-72

11. ANEXOS

11.1. Anexo A

CULTIVO DE *Daphia magna*

Medio *D. magna*- agua reconstituida

Se prepara a partir de la adición de sales inorgánicas como se indica en la siguiente tabla. Al medio se le determina la dureza, por titulación con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), esta debe encontrarse en un intervalo de 160–180 mg $CaCO_3$ /L.

Composición del agua reconstituida

Compuesto	**Solución stock (g/L)**	**mL de Stock/20 L H_2O Destilada**
$NaHCO_3$	10	300
$MgSO_4.7H_2O$	36.5	84
KCl	10	150
$CaCl_2.2H_2O$	13.5	300

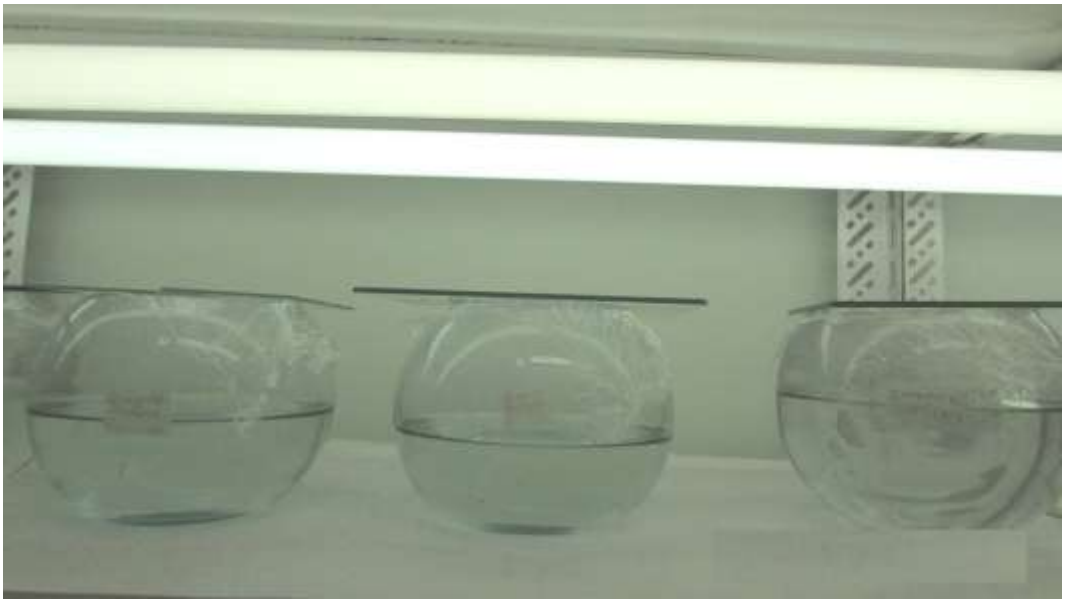
Adecuación del hábitat

Las *Daphnias* se mantuvieron en peceras con 2 litros de medio, máximo 20 individuos, con el fin de garantizar la relación de 1 *Daphnia*/100 mL de medio. Estas peceras se encontraban cubiertas para evitar contaminaciones y a temperatura ambiente que oscilaba entre 22 – 24ºC. Así mismo se contó, con reguladores automáticos de control de activación de luz ajustados a las

condiciones de 16 horas luz- 8 horas de oscuridad del fotoperiodo con una intensidad lumínica de 800-1000 lux

Cultivo de *Daphnia magna*

(Tomada en el Laboratorio de Ecotoxicología IBUN)



Limpieza y mantenimiento

La limpieza, se hace con el fin de retirar las exubias y otros residuos como algas. Se realizó diariamente y consiste en el retiro del medio y los organismos a través de una tamización, lavar el acuario con una esponja sin utilizar jabón o detergente de ningún tipo, retirando de las paredes del recipiente todos los residuos. Se recomienda hacer renovación de la mitad del medio, una vez por semana, ya que el alimento y los desechos producidos generan una variación del pH del mismo.

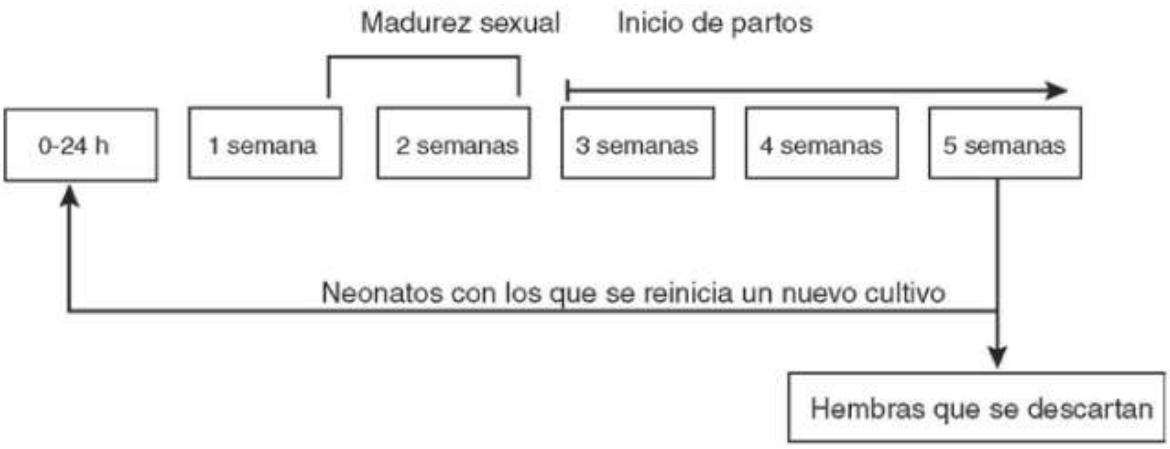
Ciclo de vida y su relación con la renovación de los cultivos

Este comprende principalmente 3 etapas: neonatos (0-24 h), los cuales son utilizados para llevar a cabo los bioensayos; la madurez sexual, la cual alcanzan en promedio a las 2 semanas y el inicio de los partos, entre la tercera y quinta

semana de cultivo. Los neonatos deben ser retirados diariamente, ya sea para hacer pruebas o para renovar los acuarios.

Ciclo de vida de *D. magna*

(Tomado de: Díaz-Báez *et al.,* 2004)



Cultivo *Selenastrum capricornutum*

Medio Bristol

Selenastrum capricornotum es una alga verde (clorofita), utilizada como alimento en el cultivo de *D. magna* en una proporción de 4.5×10^6 u. algas / individuo/ día. El cultivo de *Selenastrum* se realizó utilizando medio Bristol. La composición del medio se consigna en la suguiente tabla.

Composición del medio Bristrol

Reactivo	**Solución stock g/L agua destilada**	**mL de stock/1L H_2O destilada**
$NaNO_3$	25	10
$CaCl_2 2H_2O$	2,5	10
$MgSO_4 7H_2O$	7,5	10
K_2HPO_4	7,5	10

NaCl	2,5	10
KH_2PO_4	17,5	10
KOH	3,1g/100 mL	1
EDTA-	5, 0 g/100 mL	
$FeSO_4 7H_2O$-	0,498 g/L	1
H_2SO_4	0,1mL/100 L	
H_3BO_3	1,142g/100 mL	1
Solución de elementos traza		
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0,882 g/100 mL	1mL de solución
$MnCl_2$ $4H_2O$	0,144 g/100 mL	
MoO_3	0,071 g /100 mL	
$CuSO_4$ $5H_2O$	0,157 g/100 mL	
C0 (NO3)2 6 H2O	0,049 g/100 mL	

Las soluciones stock de $NaNO_3$, $CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4 7H_2O$, K_2HPO_4, NaCl, KH_2PO_4, KH_2PO_4, preparadas se almacenan a temperatura ambiente en recipientes de vidrio, protegidos de la luz.

Para preparar la solución de KOH-EDTA, se disuelven los 3,1 g de KOH, en 50 mL de agua destilada y cuando este se disuelve, se agregan los 5,0 g de EDTA, llevándose a volumen de 100 mL con agua destilada. De igual manera las soluciones deben ser protegidas de la luz.

La solución de $FeSO_4.7H_2O$-H_2SO_4, se realiza disolviendo 0,01 mL de H_2SO_4 concentrado en 50 mL de agua destilada lentamente, posteriormente se adiciona $FeSO_4.7H_2O$, hasta que este se disuelva por completo. Una vez lista la mezcla, se lleva a volumen de 100 mL con agua destilada y se almacena en recipiente de vidrio ámbar.

Los elementos traza deben ser mezclados por separado, con el fin de garantizar que todos estén en la misma proporción. Se preparan 25 mL de solución de cada

uno, con agua destilada, obteniéndose un volumen final de 125 mL, y se almacenan en recipiente de vidrio ámbar.

Después de obtenidas cada una de las soluciones base, estas mezclan en las proporciones ya señaladas y se afora a 1000 mL con agua destilada. El medio se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121ºC y 15 libras de presión.

Inóculo algal

Después de que el medio se enfríe, este se inocula con 3 mL de algas (2,6 x 10^5 células), se le introduce aireador y coloca el erlenmeyer al lado de una lámpara luminiscente.

Cultivo de *Selenastrum*

Cuando el medio alcanza un color verde esmeralda, se retira del montaje y se almacena en refrigeración.

Las algas decantadas se resuspenden en el medio de cultivo de *Daphnia magna.* La densidad del cultivo de algas se determina en una cámara de Neubauer. El cálculo para la cantidad de alimento que se debe administrar por acuario, teniendo en cuenta el número de *Daphnias* por acuario, se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$mL\ de\ algas/día = A \times B/C$$

donde:

A: Concentración de algas para garantizar nutrición de organismos (U. algas/mL)

B: Número de *Daphnias* por acuario

C: Concentración de *stock* de algas (U. algas /mL)

11.2. Anexo B

ENSAYOS DE SENSIBILIDAD

CONTROL POSITIVO: Dicromato de potasio
CONTROL NEGATIVO: Medio Daphnia
ESPECIE: *Daphnia magna*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 24 horas
No de neonatos: 10 por concentración
No de réplicas: 3

Bioensayo	**Concentración $K_2Cr_2O_7$ (ppm)**	**No. de organismos inmovilizados o muertos (24 horas)**			
		I	**II**	**III**	**Total**
1	1.5	9	6	5	20
	1	1	3	2	6
	0.5	0	1	1	2
	0.25	0	1	1	2
	0.125	0	0	1	1
	Control negativo	**0**	**1**	**0**	**1**
2	1.5	8	7	8	23
	1	4	3	3	10
	0.5	0	1	3	4
	0.25	0	1	1	2
	0.125	1	0	0	1
	Control negativo	**0**	**0**	**0**	**0**

3	1.5	8	6	6	20
	1	3	5	4	12
	0.5	1	2	2	5
	0.25	1	1	1	3
	0.125	0	0	1	1
	Control negativo	**0**	**0**	**1**	**1**
4	1.5	5	7	6	18
	1	3	4	6	13
	0.5	3	2	3	8
	0.25	1	1	2	4
	0.125	0	1	1	2
	Control negativo	**0**	**0**	**1**	**1**
5	1.5	8	8	8	24
	1	3	3	3	9
	0.5	1	0	1	2
	0.25	0	1	0	1
	0.125	0	0	0	0
	Control negativo	**0**	**0**	**1**	**1**
6	1.5	10	4	4	18
	1	2	4	4	10
	0.5	1	2	3	6
	0.25	1	1	1	3
	0.125	0	1	1	2
	Control negativo	**0**	**0**	**0**	**0**
7	1.5	8	6	8	22
	1	3	3	6	12
	0.5	2	4	2	8
	0.25	2	2	2	6
	0.125	1	2	0	3
	Control negativo	**1**	**0**	**1**	**2**
8	1.5	6	6	8	20
	1	4	5	6	15
	0.5	2	2	3	7
	0.25	1	2	1	4
	0.125	0	0	0	0
	Control negativo	**0**	**2**	**0**	**2**
9	1.5	7	8	6	21
	1	3	4	7	14

	0.5	2	3	2	7
	0.25	1	0	0	1
	0.125	0	0	0	0
	Control negativo	**0**	**0**	**0**	**0**
10	1.5	5	7	9	21
	1	5	4	6	15
	0.5	4	2	4	10
	0.25	3	2	2	7
	0.125	1	1	0	2
	Control negativo	**0**	**1**	**0**	**1**

11.3. Anexo C

Cultivo de *Hydra attenuata*

Los cultivos de *Hydra*, se desarrollaron en cristalizadores de 2 L con un volumen aproximado de 350 mL de medio.

Cultivo de *Hydra attenuata*

(Tomada en el Laboratorio de Ecotoxicología)

La alimentación de *Hydra*, se hace con nauplios de *Artemia salina,* producto de la eclosión de quistes de este organismo.

Alteraciones morfológicas en *Hydra attenuata,* Brugés 2007

Obtención de nauplios de *A. salina*

O,2 g de quistes se colocan en un frasco de vidrio de 250 mL, con 180 mL de solución salina al 1%. Este frasco se colocó en un cuarto con iluminación constante de 1000 lux, donde la luz se dispone directamente sobre el frasco y con aireación permanente. La temperatura ambiente osciló entre 28-31 ºC.

Incubación quistes de *Artemia*

Concluido el tiempo de eclosión (24h), los nauplios son colectados con ayuda de una pipeta Pasteur. Estos se desinfectan en una solución de Isodine® en medio *Artemia* (8 gotas/ 40 mL*).*

Recolección nauplios de *Artemia*

Los nauplios se colocan en un tamiz de malla 80 y se lavan con agua destilada para eliminar el yodo. Se resuspenden el medio *Hydra* y con una pipeta Pasteur se toma una alícuota 0.5 mL y se añade a los cristalizadores que contienen las Hydras en forma de zigzag.

Transcurrida una hora, el medio es retirado y reemplazado por nuevo. Cuatro horas después el medio es retirado de nuevo, junto con las Hydras, se lava el acuario sin usar jabón y se vuelven a colocar los *cnidarios*.

Componentes medio *Hydra attenuata*

Compuesto	Cantidad a preparar 1L
Buffer TES Acido-tris-hidroximetiletanosulfónico	110 mg
$CaCl_2$ 2 H_2O	135 mg
EDTA disódico	4 mg

Los compuestos indicados en la tabla se mezclan en un 1L de agua destilada. Se calibra el pH entre 6.9 - 7.0. Este cultivo no requiere aireación. Se pueden usar recipientes de vidrio o plástico limpios para almacenarlo a temperatura ambiente.

Para la realización de los bioensayos se preparó medio sin EDTA.

11.4. Anexo D

ENSAYOS DE SENSIBILIDAD

CONTROL POSITIVO: Dicromato de potasio
CONTROL NEGATIVO: Medio *Hydra*
ESPECIE: *Hydra attenuata*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 72 horas
No de *Hydras*: 5 por concentración
No de réplicas: 3

Bioensayo	Concentración $K_2Cr_2O_7$ (ppm)	No. de Organismos afectados (72 horas)			
		I	II	III	Total
1	2	5	4	5	14
	1	3	2	4	9
	0,5	1	1	1	3
	0,1	1	0	0	1
	0,05	0	0	0	0
	Control negativo	0	0	0	0

2	2	5	5	5	15
	1	2	2	2	6
	0,5	2	1	1	4
	0,1	1	0	1	2
	0,05	1	0	0	1
	Control negativo	0	0	1	1
3	2	4	5	4	13
	1	3	2	1	7
	0,5	1	2	1	3
	0,1	0	1	0	1
	0,05	0	0	0	0
	Control negativo	0	0	0	0
4	2	5	5	5	15
	1	3	3	3	9
	0,5	2	1	1	4
	0,1	1	1	0	2
	0,05	0	0	0	0
	Control negativo	0	0	0	0
5	2	4	5	5	14
	1	2	3	3	8
	0,5	1	2	1	4
	0,1	1	1	0	2
	0,05	0	0	1	1
	Control negativo	1	0	0	1
6	2	5	5	5	15
	1	3	3	2	8
	0,5	1	2	2	5
	0,1	1	1	0	2
	0,05	1	0	0	1
	Control negativo	0	0	0	0
7	2	5	5	5	15
	1	3	2	2	7
	0,5	1	2	1	4
	0,1	0	1	0	1
	0,05	0	0	0	0
	Control negativo	0		0	1

8	2	5	4	5	14
	1	2	4	3	9
	0,5	2	2	2	6
	0,1	0	1	1	2
	0,05	1	0	0	1
	Control negativo	0	0	0	0

11.5. Anexo E

ENSAYOS PRELIMINAR DE TOXICIDAD H_2O HUMEDAL *CARABALO* PUNTO 1 Y 2
MUESTREO 2, DICIEMBRE 2013
ESPECIE: *Daphnia magna*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 48 horas
No de neonatos: 5 por concentración
No de réplicas: 3

Punto fuente de muestra	**Concentración H_20 (V/V %)**	**No. de Organismos inmovilizados o muertos (48 horas)**			
		I	**II**	**III**	**Total**

1	100	0	1	0	1
	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	0	1	0	1
2	100	0	0	0	0
	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	0	0	0	0

ENSAYOS PRELIMINAR DE TOXICIDAD H_2O HUMEDAL *CARABALO* PUNTOS 3 Y 4 MUESTREO 2, ABRIL 2014
ESPECIE: *Daphnia magna*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 48 horas
No de neonatos: 5 por concentración
No de réplicas: 3

Punto fuente de muestra	**Concentración H_20 (V/V)**	**No. de Organismos inmovilizados o muertos (48 horas)**			
		I	**II**	**III**	**Total**
3	100	0	0	2	2
	50	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	1	0	0	1
4	100	0	0	0	0
	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0

	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	1	0	0	1

10.6. Anexo F

ENSAYOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD AGUDA EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO DICIEMBRE, 2013.
ESPECIE: *D. magna*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN 48 horas
Número de neonatos: 5 por concentración
Número de réplicas: 3

Concentración en ppm	**Extracto de éter de petróleo**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o inmóviles**
1000	0/5	0/5	0/5	0
500	0/5	0/5	0/5	0
250	0/5	0/5	0/5	0
100	0/5	0/5	0/5	0
50	0/5	0/5	0/5	0
25	0/5	0/5	0/5	0

Concentración en ppm	**Extracto clorofórmico**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o inmóviles** Total /15
1000	0/5	1/5	0/5	1/5
500	0/5	0/5	0/5	0/5
250	0/5	0/5	0/5	0/5
100	0/5	0/5	0/5	0/5
50	0/5	0/5	0/5	0/5
25	0/5	0/5	0/5	0/5

Concentración en ppm	**Extracto metanólico**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o inmóviles**

1000	0/5	0/5	0/5	0
500	0/5	0/5	0/5	0
250	0/5	0/5	0/5	0
100	0/5	0/5	0/5	0
50	0/5	0/5	0/5	0
25	0/5	0/5	0/5	0

Concentración en ppm	**Extracto acuoso**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o inmóviles**
1000	0/5	0	0/5	0/5
500	0/5	0	0/5	0
250	0/5	0	0/5	0
100	0/5	0	0/5	0
50	0/5	0	0/5	0
25	0/5	0	0/5	0

ENSAYOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD AGUDA EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO ABRIL, 2014.
ESPECIE: *D. magna*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN 48 horas
Número de neonatos: 5 por concentración
Número de réplicas: 3

Concentración en ppm	**Extracto de Éter de petróleo**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o inmóviles**
1000	0/5	0/5	0/5	0
500	0/5	0/5	0/5	0
250	0/5	0/5	0/5	0
100	0/5	0/5	0/5	0
50	0/5	0/5	0/5	0
25	0/5	0/5	0/5	0

Concentración en ppm	**Extracto clorofórmico**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o**

				inmóviles
1000	0/5	0/5	0/5	0
500	0/5	0/5	0/5	0
250	0/5	0/5	0/5	0
100	0/5	0/5	0/5	0
50	0/5	0/5	0/5	0
25	0/5	0/5	0/5	0

Concentración en ppm	**Extracto metanólico**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o inmóviles**
1000	0/5	0/5	0/5	0/5
500	0/5	0/5	0/5	0
250	0/5	0/5	0/5	0
100	0/5	0/5	0/5	0
50	0/5	0/5	0/5	0
25	0/5	0/5	0/5	0

Concentración en ppm	**Extracto acuoso**			
	I/5	II/5	III/5	**No. de Organismos muertos o inmóviles**
1000	0/5	0/5	0/5	0/5
500	0/5	0/5	0/5	0
250	0/5	0/5	0/5	0
100	0/5	0/5	0/5	0
50	0/5	0/5	0/5	0
25	0/5	0/5	0/5	0

ENSAYOS DEFINITIVOS DE TOXICIDAD AGUDA EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO DICIEMBRE, 2013.
ESPECIE: *D. magna*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN 48 horas
Número de neonatos: 10 por concentración
Número de réplicas: 3

Concentración en ppm	**Extracto Clorofórmico**			
	I/10	II/10	III/10	**No. de Organismos muertos o inmóviles**

500	0/10	0/10	0/10	0
450	0/10	0/10	0/10	0
400	0/10	0/10	0/10	0
350	0/10	0/10	0/10	0
300	0/10	0/10	0/10	0
250	0/10	0/10	0/10	0

Concentración en ppm	**Extracto metanólico**			
	I/10	II/10	III/10	**No. de Organismos muertos o inmóviles**
500	0/10	0/10	0/10	0
450	0/10	0/10	0/10	0
400	0/10	0/10	0/10	0
350	0/10	0/10	0/10	0
300	0/10	0/10	0/10	0
250	0/10	0/10	0/10	0

Concentración en ppm	**Extracto acuoso**			
	I/10	II/10	III/10	**No. de Organismos muertos o inmóviles**
1000	0/10	0/10	0/10	0
900	0/10	0/10	0/10	0
800	0/10	0/10	0/10	0
700	0/10	0/10	0/10	0
600	0/10	0/10	0/10	0
500	0/10	0/10	0/10	0

11.7. Anexo G

ENSAYOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD, AGUA HUMEDAL *CARABALO* PUNTOS 1 Y 2 MUESTREOS DICIEMBRE 2013
ESPECIE: *Hydra attenuata*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 72 horas
No de Hydras: 3 por concentración

No de réplicas: 3

Punto fuente de muestra	Concentración H_20 (V/V)	No. de Organismos afectados (72 horas)			
		I	II	III	Total
1	100	0	0	2	2
	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0
	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	0	1	0	1

ENSAYOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD, AGUA HUMEDAL *CARABALO* PUNTOS 3 Y 4 MUESTREOS ABRIL 2014
ESPECIE: *Hydra attenuata*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 72 horas
No de *Hydras*: 3 por concentración
No de réplicas: 3

Punto fuente de muestra	Concentración H_20 (V/V)	No. de Organismos afectados (72 horas)			
		I	II	III	Total
3	100	0	0	0	0
	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	0	0	0	0
4	100	0	1	0	1

	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	2.5	0	0	0	0
	Control negativo	0	0	1	1

11.8. Anexo H

ENSAYOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD, EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO DICIEMBRE, 2013.
ESPECIE: *Hydra attenuata*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 72 horas
No de Hydras: 3 por concentración
No de réplicas: 3
N: Hydras Normales; **G**: Hydras con tentáculos Globosos; **C** Hydras con tentáculos Cortos; **T**: Hydras en estado de Tulipán.

Concentración en ppm	**Extracto de éter de petróleo**			
	72h			Total Organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	3N	3N	3N	0
500	3N	3N	3N	0
250	3N	3N	3N	0
100	3N	3N	3N	0

50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

Concentración en ppm	**Extracto clorofórmico**			
	72h			Total organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	1C2G	1C2G	3G	9
500	2G1N	1C2N	3G	6
250	3N	3N	3N	0
100	3N	3N	3N	0
50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

Concentración en ppm	**Extracto metanólico**			
	72h			Total organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	3G	3G	3G	9
500	3G	2G1N	3G	8
250	3N	3N	3N	0
100	3N	3N	3N	0
50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

Concentración en ppm	**Extracto acuoso**			
	72h			Total organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	3N	3N	3N	0
500	3N	3N	3N	0
250	3N	3N	3N	0
100	3N	3N	3N	0
50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

ENSAYOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD, EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO ABRIL, 2014.
ESPECIE: *Hydra attenuata*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 72 horas
No de Hydras: 3 por concentración
No de réplicas: 3

Concentración en ppm	**Extracto de éter de petróleo**			
	72h			Total Organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	3N	3N	3N	0
500	3N	3N	3N	0
250	3N	3N	3N	0
100	3N	3N	3N	0
50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

Concentración en ppm	**Extracto clorofórmico**			
	72h			Total organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	3G	2C1G	3C	9
500	2G1N	1G1C1N	1G2N	5
250	1G2N	3N	3N	1
100	3N	3N	3N	0
50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

Concentración en ppm	**Extracto metanólico**			
	72h			Total organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	3C	2C1G	2C1G	9
500	2G1N	3G	2C1N	7
250	3N	3N	3N	0
100	3N	3N	3N	0
50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

Concentración en ppm	**Extracto acuoso**			
	72h			Total organismos afectados /9
	I/3	II/3	III/3	
1000	3N	3N	3N	0
500	3N	3N	3N	0

250	3N	3N	3N	0
100	3N	3N	3N	0
50	3N	3N	3N	0
25	3N	3N	3N	0

11.9. Anexo I

ENSAYOS DEFINITIVOS DE TOXICIDAD, EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO DICIEMBRE, 2013.

ESPECIE: *Hydra attenuata*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 72 horas
No de Hydras: 5 por concentración
No de réplicas: 3

Concentración en ppm	**Extracto clorofórmico**			
	72h			Total organismos afectados /15
	I/5	II/5	III/5	
500	3C 2G	5G	3G2N	13
450	3G1C1N	2C2G1N	2C1G2N	11
400	2G1C2N	2G3N	3G2N	8
350	2G3N	1G1C3N	1G1C3N	6
300	1C4N	1G 1C3N	5N	3
250	5N	5N	5N	0

Concentración en ppm	**Extracto metanólico**			
	72h			Total organismos afectados /15
	I/5	II/5	III/5	
500	2C2G1T	3G2C	3C2G	15
450	4G 1N	2G3C	3G 1C1N	13
400	2G3N	2C1G2N	3G2N	8
350	1C4N	1G2C3N	5N	4

300	5N	2G1N	1C4N	3
250	5N	5N	5N	0

ENSAYOS DEFINITIVOS DE TOXICIDAD, EXTRACTOS DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO ABRIL, 2014.

ESPECIE: *Hydra attenuata*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 72 horas
No de Hydras: 5 por concentración
No de réplicas: 3

Concentración en ppm	Extracto clorofórmico			
	72h			Total organismos afectados /15
	I/5	II/5	III/5	
500	5C	2C3G	3G2C	15
450	2G2C1N	4G1C	1C1G3N	11
400	4G1N	1C1G3N	1C2G2N	9
350	1C1G3N	1G4N	2C3N	4
300	5N	2G3N	5N	2
250	5N	5N	5N	0

Concentración en ppm	Extracto metanólico			
	72h			Total organismos afectados /15
	I/5	II/5	III/5	
500	3C2G	5C	5C	15
450	3C2G	4C1N	4G 1N	12
400	1C1G3N	3G2N	3G2N	8
350	2G3N	1C1G2N	1C4N	5
300	1G4N	1G4N	5N	2
250	5N	5N	5N	0

11.10. Anexo J

ENSAYOS DEFINITIVOS DE TOXICIDAD AGUDA FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN ALCALOIDES DE *Azolla* aff. *filiculoides* Lam, MUESTREO DICIEMBRE 2013-ABRIL 2014.
ESPECIE*: D. magna*
TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 48 horas
Número de neonatos: 10 por concentración

Número de réplicas: 3
CONTROL NEGATIVO: Medio Daphnia

Mes diciembre, 2013

Concentración (ppm)	fracción alcaloidal	
	No. de Organismos muertos o inmóviles/30	No. de Organismos afectados/30
500	14	16
250	9	0
100	5	0
50	3	0
25	1	0
15	0	0
Control negativo	0	0

Mes de abril, 2014

Concentración (ppm)	fracción alcaloidal	
	No. de Organismos muertos o inmóviles/30	No. de Organismos afectados/30
500	18	12
250	13	5
100	7	0
50	5	0
25	2	0
15	1	0
Control negativo	2	2