



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

VARIACIÓN TEMPORAL DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROCISTINAS Y
SU RELACION CON ALGUNOS PARÁMETROS AMBIENTALES EN
AGUAS DEL EMBALSE CLAVELLINO, ESTADO SUCRE.
(Modalidad: Investigación)

EDGAR ALEXANDER GARCIA MARCANO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2009

VARIACIÓN TEMPORAL DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROCISTINAS Y
SU RELACION CON ALGUNOS PARAMETROS AMBIENTALES EN
AGUAS DEL EMBALSE CLAVELLINO, ESTADO SUCRE.

APROBADO POR:

Dra. Luisa Rojas de Astudillo
Asesora

M.Sc. Rafael Díaz Ramos
Coasesor

Jurado Principal

Jurado Principal

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	vi
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
ÁREA DE ESTUDIO	8
RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	9
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	10
ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	11
Determinación de la concentración de oxígeno disuelto.....	11
Determinación de la concentración de amonio	12
Determinación de la concentración de nitrito (NO ₂ ⁻).....	12
Determinación de la concentración de nitrato.....	13
Determinación de la concentración de fosfato	14
Determinación de la concentración de nitrógeno total y fósforo total	14
Determinación de la concentración de clorofila <i>a</i>	14
Procedimiento para determinar la toxicidad mediante el bAs.....	15
Procedimiento para la identificación y cuantificación de microcistinas en extractos de cianobacterias por HPLC-UV	16
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	19
VARIABLES QUÍMICAS	21
VARIABLES BIOLÓGICAS	29

BIOENSAYO DE TOXICIDAD	33
Actividad toxica en <i>Artemia salina</i> sp.	33
DETERMINACIÓN DE MICROCISTINAS USANDO HPLC-UV	36
Análisis de componentes principales (ACP).....	42
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA	53
APENDICE.....	59

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por estar siempre presente y permitirme lograr mi sueño.

A mis padres por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento en momentos difíciles, por su paciencia y la confianza de que lograría esta meta.

A mis hermanos por motivarme siempre y no permitir que me detuviera en ningún instante.

A mis familiares que siempre estuvieron presentes para darme motivación y buenos deseos.

A Marianny esa persona tan especial que ha sabido acompañarme y apoyarme en todo momento.

A mis amigos que siempre estuvieron conmigo a lo largo de carrera y aquellos que el destino le impidió seguir como Jesús Agustín Rodríguez y Carlo Tulio Badaracco.

A todas esas personas que de alguna u otra manera estuvieron conmigo presente, a todos ellos les dedico este triunfo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, y en especial al departamento de Química, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su estudiantado, por los conocimientos adquiridos y convertirme en un profesional. A los departamentos de Oceanografía, Biología Marina y Biología Pesquera, del instituto Oceanográfico de Venezuela. A la compañía Hidrológica del Caribe HIDROCARIBE por el apoyo económico en realización de los muestreos y al Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela por el inmenso apoyo en la finalización de este trabajo.

A mi asesora la Dra. Luisa Rojas de Astudillo por la confianza depositada en mi y su disposición incondicional en el desarrollo de este trabajo. Al M.Sc Rafael Díaz Ramos, mas que coasesor un amigo siempre dispuesto a ayudarme en la elaboración de mi trabajo. Al Dr. Ernesto González por sus consejos y ayuda en el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Andrés Alcalá por su gran ayuda para los análisis cromatograficos. Al M.Sc. Gregorio Martínez Campos, los técnicos del I.O.V. Deudedith Hernández y Adelskis Márquez por su disposición y ayuda en los distintos análisis realizados. A la M.Sc. Lina Charzeddine por su ayuda efectiva y palabras de aliento. A mis amigos Alexander García, José Castro, Marelis Cova, Carleth Laguado, Enfred Rodríguez, Leidismar Garelli, Glen Nazaret, Louimar Antón, Mariamelis Alzolar, Vladimir Rodríguez, por haber puesto su grano de arena en este trabajo, y mis compañeros de laboratorio Lorelys, Michael y Karla por toda la colaboración prestada y todo aquel que de una u otra manera colaboro en la realización de este trabajo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de muerte en <i>Artemia salina</i> durante 24 h a varias concentraciones de diferentes tipos de microcistina, tomado de Lee y Chou (1997)...	6
Tabla 2. Estadísticos básicos de las variables físicas-químicas y biológicas medidas en el embalse Clavellinos, estado Sucre, durante el período 17/01/2007 a 01/11/2007.	18
Tabla 3. Cianobacterias identificadas durante el estudio.	31
Tabla 4. Cianobacterias más abundantes identificadas durante el estudio.....	31
Tabla 5. Actividad toxica de los extracto de cianobacterias en metanol en <i>A. salina</i> en las estaciones ubicadas en el embalse Clavellino desde enero hasta noviembre de 2007.....	34
Tabla 6. Valores de CL_{50} obtenidos a partir del bAs en las estaciones ubicadas en el embalse Clavellino desde enero hasta noviembre de 2007.....	35
Tabla 7. Concentración de las microcistinas R-R y R-L en muestras de agua del embalse Clavellino, Edo. Sucre, usando HPLC con detector de UV.....	42
Tabla 8. Porcentajes de la variancia total explicada por los tres primeros componentes del ACP de las variables medidas en el embalse clavellino, enero – noviembre de 2007.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de una microcistina, ciclo-(D-Ala ¹ -X ² -D-MeAsp ³ -Y ⁴ -Adda ⁵ -D-Glu ⁶ -Mdha ⁷) (McElhiney y Lawron 2005).....	5
Figura 2. Embalse Clavellino mostrando la ubicación de las estaciones fijadas en el estudio.	8
Figura 3. Variación espacial (A) y temporal (B) de la transparencia del agua (m) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007. ..	19
Figura. 4 Variación espacial (A) y temporal (B) de la temperatura (°C) del agua medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre de 2007.....	20
Figura 5. Variación espacial (A) y temporal (B) de pH del agua medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.....	21
Figura 6. Variación espacial (A) y temporal (B) del oxígeno disuelto en el agua (mg·l ⁻¹) medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.....	22
Figura 7. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de amonio (μmol·l ⁻¹) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y Noviembre del 2007.....	23 23
Figura 8. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de nitrito (μmol·l ⁻¹) medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.....	24
Figura 9. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de nitrato (μmol·l ⁻¹) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.....	25
Figura 10. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de nitrógeno total (μmol·l ⁻¹) medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.....	26
Figura 11. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de fosfato..... (μmol·l ⁻¹) Medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y	27 27

noviembre del 2007.....	27
Figura 12 Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de fósforo total ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.....	28
Figura 13. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de clorofila a ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.....	29
Figura 14. Abundancia de las cianobacterias en el embalse Clavellino.	30
Figura 15. Cromatograma obtenido del patrón de microcistina R-R (A) y L-R (B) a una concentración de $250\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	37
Figura 16. Curva de calibración de la microcistina R-R usando HPLC con detector UV.....	38
Figura 17. Curva de calibración de la microcistina L-R usando HPLC con detector UV.....	38
Figura 18. Cromatograma de microcistina R-R extraída con ácido acético al 5%. Muestra colectada en la estación 04 (embalse Clavellino) el 07/02/2007.	39
Figura 19. Cromatogramas de microcistina L-R extraídas con ácido acético al 5%. A y B, muestras colectadas en las estaciones 01 y 04 el 09/05/2007; y C muestra colectada en la estación 01 el 21/06/2007 (embalse Clavellino).	40
Figura 20. Cromatogramas de microcistina L-R extraídas con ácido acético al 5%. A, muestra colectada en la estación 03 el 21/06/2007; B y C, muestras colectadas en las estaciones 01 y 02 el 12/07/2007 (embalse Clavellino).....	41
Figura 21. Cromatograma de microcistina L-R extraída con ácido acético al 5%.	42
Muestra colectada en la estación 03 (embalse Clavellino) el 30/08/2007.	42
Figura 22. Proyección ortogonal de algunas variables físico-químicas y biológicas en el espacio definido por los dos primeros componentes del ACP en el embalse Clavellino desde enero a noviembre de 2007.	43

RESUMEN

Se estudió la variación de la concentración de microcistinas y su relación con algunos parámetros ambientales en el embalse Clavellino, estado Sucre, Venezuela, desde enero hasta noviembre de 2007. Para tales fines se fijaron cuatro estaciones georeferenciadas, de las cuales tres se encontraban en el canal central del embalse y una en la orilla. Se obtuvieron los siguiente valores promedios: 2,2 m de transparencia, 29 °C de temperatura, 8,06 unidades de pH, 10 ml·l⁻¹ de O₂, 0,32 μmol·l⁻¹ de NH₄⁺, 0,25 μmol·l⁻¹ de NO₂⁻, 0,70 μmol·l⁻¹ de NO₃⁻, 28,94 μmol·l⁻¹ de nitrógeno total, 0,23 μmol·l⁻¹ de PO₄³⁻, 0,53 μmol·l⁻¹ de fósforo total y 15,04 μg·l⁻¹ de clorofila *a*. Además, se identificaron dos variantes de microcistinas, la L-R y la R-R. La primera, con un valor promedio de 0,75 μg·l⁻¹, siendo detectada en 8 muestreos, el máximo valor (1,81 μg·l⁻¹) de microcistina L-R fue superior al establecido por la Organizaron Mundial de la Salud (O.M.S.), como seguro para aguas de consumo humano y animal. Se determinó la existencia de una relación inversa entre la concentración de microcistina y el pH. Además, se encontró que en el embalse el aumento de la clorofila *a* depende de las concentración de nitrógeno total.

Palabras o Frases Claves: Cianobacteria, microcistina, Toxinas

INTRODUCCIÓN

El establecimiento y la expansión de las poblaciones humanas están supeditadas al abastecimiento de agua dulce, lo que implica que un alto porcentaje de las aguas interiores del mundo está sometido al efecto más o menos intenso de las actividades antrópicas (Infante, 1988). Con frecuencia, los desechos que resultan de las actividades humanas (domésticas, agrícolas e industriales) se incorporan, en último término, a los cuerpos de agua, resultando en cambios físicos y químicos, por consiguiente, afectando las comunidades que en ellos viven. Aunque el ambiente acuático tiene cierta capacidad para asimilar los desperdicios que se vierten en él, existe un límite para esa capacidad. Cuando los desechos arrojados son excesivos, el cuerpo de agua no puede asimilarlos y se produce una acumulación de nutrientes, de biomasa y un aumento de la producción del sistema. Todo esto genera desajustes entre las comunidades existentes, entre ellas el fitoplancton (González *et al.*, 2004b), el cual constituye la base fundamental de las tramas tróficas en las zonas de aguas abiertas de lagos y embalses (Lacroix, 1992).

La comunidad fitopláctonica está sometida a una fuerte influencia estacional y en las zonas tropicales se registran grandes contrastes entre las asociaciones de especies en las épocas de lluvia y sequía (Horne y Goldman, 1994). La diferencia se produce por cambios en las condiciones climáticas y fisicoquímicas de una estación a otra (Wetzel, 2001). La presencia de nutrientes determina, en primera instancia, la productividad primaria del sistema, base fundamental de una parte sustancial de la trama trófica acuática. La relación es tan estrecha que otros factores como la luz y la concentración de dióxido de carbono han sido relegados como posibles limitantes en este proceso. La carencia o exceso de nutrientes originan severas consecuencias sobre la biota acuática. La escasez de nutrientes está asociada a aguas oligotróficas,

esto es, con áreas o sistemas acuáticos completos con una mínima producción primaria. En el otro extremo, se encuentran las aguas o sistemas distróficos o hipereutróficos, donde la generación continua y masiva de biomasa, principalmente fitoplanctónica, genera serios problemas en el flujo energético (Contreras *et al.*, 1995). Una manera de conocer o estimar el crecimiento y distribución en las comunidades fitoplanctónicas y de relacionar sus variaciones espaciales y temporales con los parámetros fisicoquímicos en el agua, donde éstas se desarrollan, es el estudio o cuantificación de los pigmentos. El mismo responde a variaciones climáticas y meteorológicas del medio ambiente (Zingone y Sarno, 2001). Los análisis cuantitativos de la clorofila *a* (chl *a*) permiten estimaciones por un método químico, el cual es más exacto y sencillo que otros métodos, como el conteo celular. La concentración de chl *a* está influenciada por factores como la temperatura, luz, pH y elementos nutritivos. Se ha comprobado que la concentración de la misma decrece en agua de condiciones oligotróficas, es decir, en medios deficientes de fósforo, nitrógeno, magnesio y hierro, los cuales son necesarios para el óptimo crecimiento del fitoplancton (Ferraz-Reyes, 1988).

Entre las especies fitoplanctónicas, se encuentran las cianobacterias o cianofíceas (algas verde-azules), las cuales son microorganismos procariontes, aeróbicos y anaeróbicos facultativos, que obtienen su energía a partir de la fotosíntesis. En el grupo se incluyen algunos de los organismos más primitivos de la tierra; su origen se estima en unos 3 500 millones de años (Carmichael, 1994). Las cianobacterias dominan la comunidad fitoplanctónica en ambientes dulce-acuícola, con pH entre 6 y 9, temperaturas entre 15 y 30°C y prefieren altas concentraciones de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (Roset y Aguayo, 2001). Son fuentes útiles de clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas, exopolisacáridos, proteínas y otros metabolitos biológicamente activos (Loreto *et al.*, 2003).

Las cianobacterias pueden hallarse suspendidas, flotando libremente o

adheridas a diversos tipos de sustratos. Algunas especies son capaces de sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas, como en desiertos, aguas termales y lagos alcalinos (Rosales *et al.*, 2005). Bajo ciertas condiciones ambientales, pueden multiplicarse rápidamente formando colonias claramente visibles, como una capa espumosa cuyo color varía de azul-verdoso a pardo-amarillento. Estos eventos se denominan floraciones algales nocivas (FAN) y se estima que más del 50% de éstas sean tóxicas. Las toxinas presentes producidas por estos organismos son muy potentes y producen efectos agudos y crónicos en el hombre, en animales y vegetales.

Las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por el consumo de agua contaminada por cianobacterias se registraron en Australia, Inglaterra, China y África del Sur. En Brasil, se conocen varios casos, pero el más grave fue el episodio de Caruaru (Brasil) en 1996. En ese evento, murieron más de 50 personas sometidos a hemodiálisis en la que se utilizó agua contaminada con toxinas de cianobacterias (Azevedo *et al.*, 2002).

Se ha determinado que en una misma especie, pueden existir cepas productoras y no productoras de toxinas. En muchos casos, las toxinas son metabolitos secundarios en la formación de los fotopigmentos, que se acumulan en el citoplasma en determinadas situaciones. La producción de estas endotoxinas es máxima cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, por este motivo, se observa una producción directamente proporcional al aumento de la biomasa (Robillo *et al.*, 2000). Los compuestos tóxicos son de tres tipos (péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos). Se ha determinado que: los péptidos cíclicos son hepatotóxicos; los alcaloides tienen propiedades dermo-neuro y hepatotóxicas; y los lipopolisacáridos son de tipo irritante (De Leon y Yunes, 2001). Entre los péptidos cíclicos, se encuentran las microcistinas que son toxinas de bajas masas molares, producidas por diferentes especies de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Nostoc* (Hilborn *et al.*, 2005). Más del 60% de los casos de

intoxicación en todo el mundo son generadas por las microcistinas, las cuales bloquean los canales de sodio y en ciertos animales producen pérdida del movimiento, convulsiones, parálisis respiratoria e, incluso, la muerte.

Estas toxinas son hepatotóxicas en humanos, aunque, también, dan lugar a alteraciones gastrointestinales, reacciones alérgicas o irritación y sintomatología similar a la de la neumonía, choque hipovolémico dando lugar a la muerte, en un periodo de 4 a 24 horas o en días, dependiendo de la cantidad de toxina ingerida. Diversos estudios epidemiológicos relacionan la incidencia de cáncer hepático, mutaciones y malformaciones congénitas, (durante el primer trimestre de embarazo), con el consumo de aguas contaminadas por microcistinas (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999; Sivonen y Jones, 1999; Azevedo *et al.*, 2002). Los estudios realizados en China han revelado una alta incidencia de cáncer, principalmente de hígado, producto de estas hepatotoxinas cíclicas (Chorus y Bartram, 1999), por lo que están consideradas como un problema ambiental, ecotoxicológico y principalmente sanitario.

Las microcistinas en su estructura presentan un anillo peptídico de siete aminoácidos, de los cuales sólo dos pertenecen a las proteínas (Fig. 1). Estos dos aminoácidos permiten reconocer los distintos tipos de moléculas. Cada microcistina es designada con un nombre dependiendo de los aminoácidos que completan su estructura (Fischer y Dietrich, 2000).

Ante la presencia de un florecimiento de cianobacterias, debe aplicarse el principio de precaución, asumiéndose como toxigénico mientras no se demuestre lo contrario. Un procedimiento de monitoreo comprendería: muestreo periódico, análisis microscópico para identificar y contar las colonias de cianobacterias y ensayos de toxicidad aguda por exposición intraperitoneal en ratón. Según la sintomatología, se procede a la confirmación de presencia de hepatotoxinas o neurotoxinas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de ultravioleta (HPLC-UV).

Ésta es una de las técnicas más aceptadas por la comunidad científica internacional en la detección de estas toxinas. La separación de los compuestos tóxicos se realiza en una columna C₁₈ utilizando metanol o acetonitrilo como fase móvil; una vez separados, se procede a determinar su absorción con el detector ultravioleta. La mayoría absorbe en una longitud de onda específica de 238 nm.

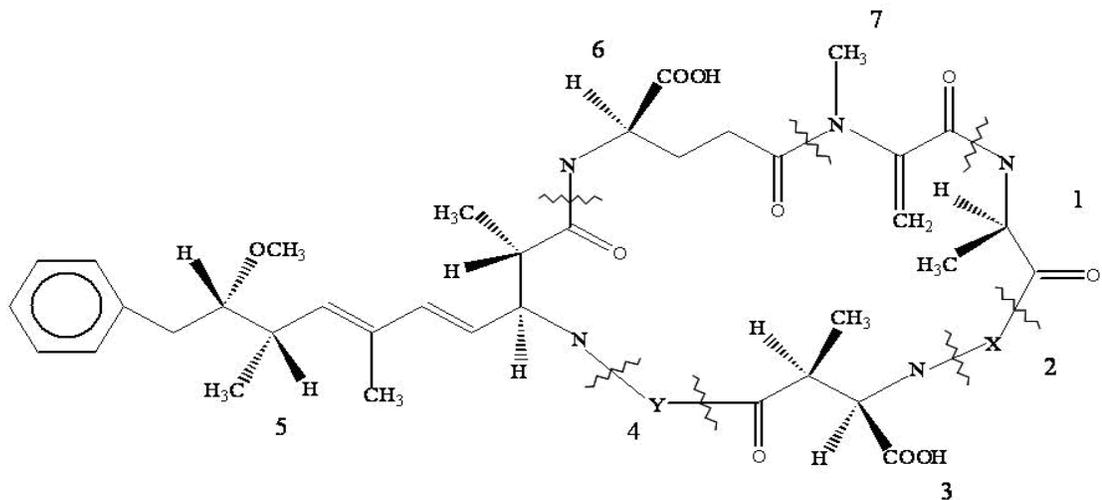


Figura 1. Estructura general de una microcistina, ciclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Y⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷) (McElhiney y Lawron 2005).

Una técnica accesoria es el ensayo inmunoenzimático ligado a una enzima (ELISA) el cual es una modificación del radioinmunoensayo (RIA). Este método se basa en el ataque de anticuerpo a microcistinas. Además, está el ensayo de inhibición de la fosfatasa el cual es un método basado en la propiedad de las microcistinas como inhibidores de ésta. Otra técnica de fácil aplicación es el bioensayo con organismos acuáticos, como la *Artemia salina* (bAs), en el cual se colocan larvas en un medio controlado con una concentración definida de los extractos y se evalúa la tasa de mortalidad, transcurrido un tiempo determinado. Este último se realiza con un procedimiento estadístico, en el cual se calcula la concentración letal media (CL₅₀). La CL₅₀ indica el nivel de toxicidad en el extracto analizado. Lee y Chou (1997) evaluaron toxicidades a varias concentraciones de diferentes especies de

microcistinas mediante el bAs (Tabla 1), determinando que la microcistina R-A es la más tóxica, con una concentración letal media (CL₅₀) de 12,7 µg·ml⁻¹.

En caso de determinarse la presencia de una floración nociva, debería desplegarse un conjunto de medidas para evitar el acceso de personas y animales a los cuerpos de agua, así como limitar los usos de ésta. Finalmente, es importante estimular la investigación, el desarrollo y la innovación de técnicas de detección, cuantificación y eliminación de toxinas y cianobacterias, sistemas de predicción de riesgos, e incorporar sistemas de vigilancia y control de la presencia de cianobacterias y sus toxinas, al menos en las redes de suministro de agua potable, especialmente, en las épocas más calurosas del año (Roset y Aguayo, 2001).

Tabla 1. Porcentaje de muerte en *Artemia salina* durante 24 h a varias concentraciones de diferentes tipos de microcistina, tomado de Lee y Chou (1997).

Microcistina	Porcentaje de muerte de <i>Artemia salina</i> en 24 h					CL ₅₀ (µg·ml)
	30µg·ml	25µg·ml	20µg·ml	10µg·ml	5µg·ml	
M. FR	100	84	64	-	0	17,6
M-WR	100	92	-	27	0	13,2
M-LR	100	84	16	-	0	22,3
M-RR	100	90	-	7	0	16,2
M-RA	100	92	91	-	0	12,7
[Dha]M-RR	100	89	54	-	0	19,6

En vista de los problemas que generan las floraciones de cianobacterias, en las reservas de agua destinadas al consumo humano y la recreación, es necesario realizar una evaluación para un seguro aprovechamiento de éstas. En este trabajo, se identificó y cuantificó las microcistinas producidas por las cianobacterias presentes en el embalse Clavellino, estado Sucre, por medio de la técnica de cromatografía

liquida de alta presión (HPLC). También, se determinó la toxicidad mediante la técnica del bAs y se relacionó la concentración de la microcistinas con algunos parámetros fisicoquímicos.

METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO

El embalse Clavellino se encuentra ubicado en la ribera del río homónimo, (municipio Ribero, estado Sucre) en $10^{\circ} 19'$ y $10^{\circ} 23'$ N y $63^{\circ} 35'$ y $63^{\circ} 40'$ W a 290 msnm (Fig. 2). El embalse abarca un área de 1 050 hectáreas con un volumen de agua de 135 Mm^3 , una profundidad máxima de 30 m y una profundidad promedio de 19 m (González, 1978 y Benítez, 1984; citados por Ferraz-Reyes y Fernández, 1988).

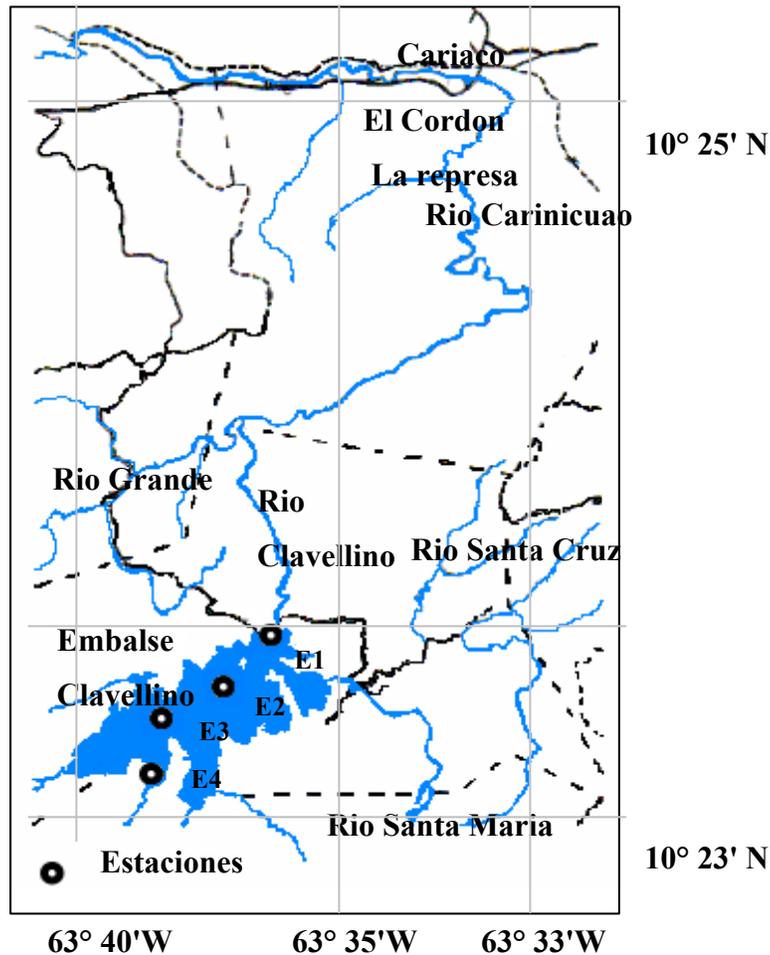


Figura 2. Embalse Clavellino mostrando la ubicación de las estaciones fijadas en el estudio.

El embalse Clavellino fue creado el 11 de julio de 1968, con el propósito de suministrar agua potable a las Islas de Margarita, Coche, la población de Carúpano y las vecinas a Cariaco. El valle del río Clavellino y, en especial, la parte del cierre de la represa, consiste en formaciones de lutitas, areniscas y calizas estratificadas casi verticalmente y muy permeables. Entre otros ríos tributarios de importancia, se encuentra el río Santa Cruz y el río Santa María. El embalse se encuentra delimitado por el norte con carretera que une a la población de Muelle de Cariaco con Caripe del Guácharo y pasa por el aforo de la represa. Por el oeste se encuentran potreros y sembradíos y hacia el sur y el este, pequeñas poblaciones y cultivos varios. Según Ferraz-Reyes y Fernández (1988), la variación de la temperatura en el embalse hace que este sea monomítico cálido. El periodo de estancamiento ocurre aproximadamente de abril- mayo hasta noviembre. Los vientos alisios provocan la mezcla del agua a partir de diciembre. Por otra parte, Gómez (2006) observó que durante mayo, junio y octubre de 2005, presentó un color verde, predominó el viento del este, y existía un fuerte olor sulfuroso. En ese estudio también se detectaron altas concentraciones de microcistina L-R ($129,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

En el embalse Clavellinos se fijaron tres estaciones ubicadas en el canal central y una cerca del aforo del embalse. Los muestreos se realizaron quincenalmente durante la temporada de sequía y transición (enero - julio), y mensualmente durante el periodo de lluvia (julio - noviembre de 2007). Por razones de logística solo se tomaron muestras en la orilla (estación 01) los días: 01/03, 28/03, 11/04, y 06/06. La transparencia del agua se determinó con un disco secchi de 25 cm de diámetro, mientras que la temperatura y el pH fueron medidos *in situ* con un medidor de pH portátil marca Thermo Orión, modelo 261S. Las muestras de agua superficial fueron recolectadas manualmente con un recipiente plástico. Para determinar la concentración de oxígeno disuelto ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) se tomaron muestras en botellas de DBO,

en las cuales se fijó el oxígeno disuelto, con los reactivos descritos por el método de Winkler: Se añadió una solución de manganeso (II) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (reactivo 1) e, inmediatamente, una solución de yoduro de potasio alcalinizado KI-NaOH, (reactivo 2). La muestra se mantuvo en la oscuridad hasta el momento de su análisis. Seguidamente, se tomaron muestras para análisis de nutrientes (nitrito, nitrato y fosfato) en botellas de polietileno de (250 ml), las cuales se mantuvieron a baja temperatura, almacenándolas en una cava con hielo durante su transporte en el laboratorio. Allí se congelaron hasta el momento del análisis. Para el caso del amonio, se utilizó botellas de vidrio de (150 ml), y la muestra se fijó *in situ* con una solución de hipoclorito de sodio (reactivo 1) y una solución de fenol nitroprusiato (reactivo 2). Para la determinación de la concentración de chl *a*, se tomaron muestras con un recipiente plástico ámbar de 1 l. Además, se filtraron 200 litros de agua con un tamiz de 60 μm . El material retenido en el tamiz se vertió en una botella plástica ámbar y se enrasó a 1 litro con agua filtrada del mismo lugar. Estas muestras se almacenaron en una cava con hielo para su transporte al laboratorio. De allí, se tomaron 750 ml para realizar el bAs y 250 ml para los análisis por HPLC.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras fueron concentradas usando una bomba de vacío GAST. Para esto, se utilizaron filtros de fibra de vidrio (1,5 μm de poro, 4,7 cm de diámetro). Posteriormente, las muestras concentradas que se utilizaron para la determinación de chl *a* se protegieron de la luz, cubriéndolas con papel de aluminio, y se congelaron por un periodo menor a tres semanas antes de su análisis. Las requeridas para el bAs y HPLC se concentraron del mismo modo y se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente, hasta el momento del análisis. Por otra parte, las muestras para la identificación y conteo de cianobacterias se procesaron siguiendo el método de Utermohl (1958) en el Laboratorio de Fitoplancton del Departamento de Biología del Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV-UDO).

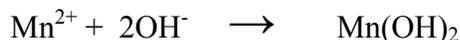
ANALISIS DE MUESTRAS

Determinación de la concentración de oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto se determinó por el método de Winkler, descrito por Strickland y Parsons (1972). Las concentraciones de O₂ se expresaron en mg·l⁻¹.

Principio del método

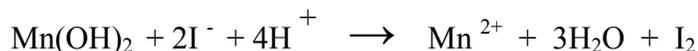
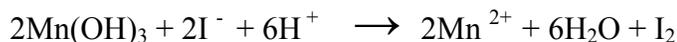
Al agua a analizar se le añadió una solución de Mn (II), con la cual precipita el hidróxido de manganeso por la presencia de una base fuerte (NaOH)



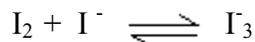
Por una reacción en medio heterogéneo, con el oxígeno disuelto ocurre una reacción de óxido reducción, en la cual el manganeso cambia a números de oxidación más elevados (III y IV).



Cuando el oxígeno reaccionó completamente, se acidificó el medio con H₂SO₄ concentrado; el precipitado se disolvió y el Mn vuelve a su estado de oxidación (II), oxidando los iones yoduros a yodo que habían sido previamente introducidos (yoduro de sodio) junto con la base fuerte

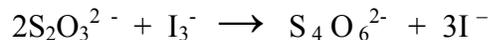


En presencia del exceso de yoduro se establece el equilibrio



El yodo es titulado con tiosulfato de concentración (0,01 mol·l⁻¹), utilizándose

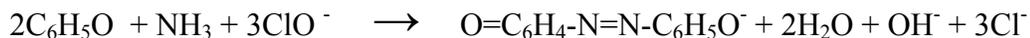
una solución de almidón como indicador



El tiosulfato de sodio se valoró con una solución patrón de yodato de potasio ($0,01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Determinación de la concentración de amonio

La concentración de amonio (NH_4^+) se determinó por el método descrito por Koroleff (1969). En este método se mide la totalidad del nitrógeno amoniacal, es decir, $\text{N-NH}_3 + \text{NH}_4^+$. El método colorimétrico utiliza como reactivo una solución de hipoclorito, en medio ligeramente básico que, posteriormente, en presencia de un exceso de hipoclorito forma un complejo azul de indofenol; además, se usó nitroprusiato que actúa como catalizador de la reacción. El indofenol fue medido a una longitud de onda de 640 nm en un espectrofotómetro de marca Thermo Spectronic modelo Genesis™ 8 y los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

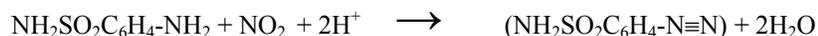


Determinación de la concentración de nitrito (NO_2^-)

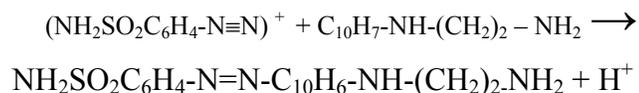
Se determinó según el método de Bendscheider y Robinson (1952), descrito por Strickland y Parsons (1972).

Principio del método

Los iones nitrito forman un diazócico con la sulfanilamida en medio ácido ($\text{pH} < 2$), según la reacción:



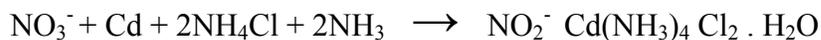
Después, el diazónico reacciona con el N-naftil-etilendiamina para formar el colorante



Esta solución rosada fue medida a una longitud de onda de 543 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic, modelo Genesis™ 8, y las concentraciones se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Determinación de la concentración de nitrato

La determinación de la concentración de nitrato (NO_3^-) se realizó por el método descrito por Tréguer y Le Corre (1975). Este método está basado en convertir los iones nitrato en nitrito, para ello se colocó una alícuota de 4 ml de cada muestra en el auto analizador Technicon II. En el aparato de manera automática ocurre el siguiente proceso: se agrega cloruro de amonio (NH_4Cl a pH 8,5) a cada muestra. Seguidamente, la muestra pasa por una columna reductora de cadmio metálico previamente activada con sulfato de cobre (Wood *et al.*, 1967) para reducir los iones nitrato a nitrito. Luego, se le añadió la solución etilendiamina – ácido clorhídrico y, por último, la N-naftiletildiamonio, dando a la muestra una coloración púrpura. Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 543 nm. Los resultados de las concentraciones se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$



Determinación de la concentración de fosfato

El método colorimétrico de Murphy y Riley (1962), es actualmente uno de los más rápidos y simples para la determinación de los iones ortofosfatos en el agua. La forma mineral mayoritaria es exactamente la de ortofosfatos, cuyos iones se presentan en las formas: PO_4^{3-} (10%), HPO_4^{2-} (90%) y H_2PO_4^- (< 1). Los iones ortofosfato reaccionaron con el molibdato de amonio, en presencia de antimonio (II) para formar un complejo que luego fue reducido por el ácido ascórbico, esta forma reducida produce una coloración azul, la cual fue medida a una longitud de onda de 885 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic, modelo Genesis™ 8. Sus concentraciones se expresaron en $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Determinación de la concentración de nitrógeno total y fósforo total

La concentración de nitrógeno total y fósforo total se determinó según el método descrito por Valderrama (1981), con las modificaciones de Senior (1987). Por este método, se analizaron simultáneamente el nitrógeno total y fósforo total en la misma muestra. El reactivo oxidante, está formado por una solución de peroxodisulfato de potasio, ácido bórico e hidróxido de sodio $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. En la oxidación simultánea, la reacción comienza a pH 9,7 y termina a pH 5,6. Estas condiciones se obtienen utilizando el sistema ácido bórico-hidróxido de sodio (Valderrama, 1981). El tiempo de digestión para las muestras no fue mayor de 30 minutos a 110–115°C.

Determinación de la concentración de clorofila *a*

Se determino la concentración de chl *a* en $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ a través del método de Lorenzen descrito y mejorado por Strickland & Parsons (1972). Se introdujo el filtro con la muestra concentrada en un tubo de ensayo con 8 ml de acetona al 90%. La extracción de los pigmentos se realizó colocando la muestra protegida de la luz por

un tiempo no mayor a 24 horas. Seguidamente, el filtro con la muestra se trituró con una varilla de vidrio y se procedió a centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 665 nm y 750 nm, en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-120). Luego, a la solución se le agregaron dos gotas de HCl 1 mol·l⁻¹ y se midió de nuevo su absorbancia a 665 nm y 750 nm,

$$\text{Clorofila} = 26,7 (A_{665o} - A_{750o}) - (A_{665a} - A_{750a}) \times V_1 / V_2,$$

donde:

A_{665o}: Absorbancia medida sin ácido. A_{665a}: Absorbancia medida con ácido.

A_{750o}: Absorbancia medida sin ácido. A_{750a}: Absorbancia medida con ácido.

V₂: Volumen de la muestra filtrada. V₁: Volumen de acetona.

Procedimiento para determinar la toxicidad mediante el bAs

Los extractos obtenidos de las diferentes estaciones fueron procesados usando el método empleado de Meyer *et al.* (1982). Cada muestra se extrajo 3 veces con 3 ml de metanol. El extracto se evaporó al vacío. Posteriormente, se pesaron aproximadamente 50 mg del extracto seco y se disolvieron en 0,5 ml de metanol y 4,5 ml de agua de mar filtrada, resultando en concentraciones de 10000 µg·ml⁻¹ de material seco·ml⁻¹. Seguidamente, se hicieron diluciones con agua de mar filtrada y se obtuvieron concentraciones de 1000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 µg·ml⁻¹ para luego tomar 5 ml de cada una y colocar de 10 a 20 nauplios de *A. salina*. Después de 24 h, se cuantifico el número de organismos muertos en cada vial.

Finalmente, los datos se analizaron utilizando el programa de computación CL₅₀ de análisis estadístico diseñado por Stephan (1977). El programa realiza el calculo directo mediante cuatro diferentes métodos proporciona un estimado de los limites de confianza de un 95 %. Los métodos utilizados por el programa son: Moving Average, Probit, Logit y Binomial.

El Método Moving Average se basa en una interpolación numérica de las concentraciones utilizadas y los resultados de mortandad obtenidos para cada concentración. El método Probit es un método paramétrico basado en una transformación Probit; esta transformación resulta en un ajuste que logra normalizar los datos, generando una curva sigmoideal, que al ser sometido a una transformación logarítmica, logra una linealización de la misma. Por otra parte, el método Logit o Logístico, al igual que el Probit, corresponden a un método paramétrico que resulta en una función sigmoideal y el método Binomial es aplicable a distribuciones de datos, cuyo ajuste es un modelo binomial. Dichas distribución, en ensayos de toxicidad, se producen cuando no existen mortandades parciales, si no una serie de concentraciones bajas con un 0% de mortandad y en el resto de las concentraciones mas altas, una mortandad total 100% (Escaplés, 1999).

La ventaja del programa de Stephan (1977), que incorpora varios métodos para calcular el CL_{50} radica en tener disponibles varias opciones que permiten escoger las que tienen mayor ajuste a la distribución de datos obtenidos en un bioensayo en particular. Esto reduce considerablemente el tedioso proceso de repetir varias veces el bioensayo hasta lograr el ajuste deseado. Según este programa, la CL_{50} mas confiable esta determinada por el método que presenta el intervalo mas estrecho de limites de confiabilidad (Palacios y Pereira, 2000)

Procedimiento para la identificación y cuantificación de microcistinas en extractos de cianobacterias por HPLC-UV

Las muestras fueron preparadas para la identificación y cuantificación de microcistinas usando una modificación del método empleado por Lee y Chou (1997) que consiste en inyectar directamente el extracto obtenido al HPLC, sin tratamiento de limpieza previa. Se pesaron aproximadamente 50 mg de materia seca de cada

muestra de cianobacterias. Cada muestra se extrajo 3 veces con 3 ml de ácido acético acuoso al 5% y se agitó por 30 min. El extracto combinado se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, se colectaron 20 μ l del supernadante para inyectarlos al equipo de HPLC con detector UV. Se utilizó una columna Hypersil ODS de 5 μ m de poro y 4,0x125 mm de diámetro y como fase móvil, acetato de amonio ($0,01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): acetonitrilo (3:1, V/V), con un flujo de $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Las concentraciones de las toxinas se determinaron por comparación del área del pico de cada toxina con los de los patrones calibrados (CALBIOCHEM). Se evaluó la metodología utilizada de acuerdo con los parámetros de control de calidad: selectividad, sensibilidad, exactitud, precisión y límite de detección.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las diferencias espaciales y temporales de las variables estudiadas se efectuó un análisis de variancia no paramétrico propuesto por Kruskal-Wallace, (Boyer *et al.*, 2000) y para establecer las posibles relaciones entre éstas, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) a partir de una matriz de correlación múltiple (Johnson y Wichern, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo de muestreo, el agua mantuvo un color verde y predominaron los vientos del este. A medida que el nivel del agua descendió se observó claramente la presencia de la macroalga *Chara* sp., la cual al secarse y descomponerse generó olores característicos de este proceso. Durante el periodo de lluvia, el cielo estuvo nublado y se observaron objetos flotantes, como troncos y ramas de árboles, cerca de la cuarta estación. Además, se notó la presencia de espumas y plantas acuáticas, como el lirio de agua, en el canal central del embalse. Los estadísticos básicos de las variables estudiadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Estadísticos básicos de las variables físicas-químicas y biológicas medidas en el embalse Clavellinos, estado Sucre, durante el período 17/01/2007 a 01/11/2007.

Variable	N	Promedio	S	Mínimo	Máximo
Transparencia (m)	27	2,2	0,5	1	3,1
T_agua (°C)	44	29	1	28	31
Amonio ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	0,32	0,26	0,03	1,73
Nitrato ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	0,70	0,16	0,07	6,71
Nitrito ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	0,25	0,23	0,03	0,77
Nitrógeno Total ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	28,9	4,3	21,73	37,04
Fosfato ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	0,23	0,05	0,12	0,43
Fósforo Total ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	0,53	0,11	0,34	0,79
pH	40	8,06	0,23	7,20	8,70
Oxígeno Disuelto ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	10	1,5	6,59	12,43
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	15	13	N.D	55,53
Microcistina R-L ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	0,75	0,45	0,35	1,81
Microcistina R-R ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	44	0,14	-	0,14	0,14

N: Tamaño de la muestra; S: Desviación Estándar; T agua: Temperatura del agua, N.D: No detectable.

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Se detectaron diferencias significativas en la transparencia del agua con respecto a las estaciones ($Kw= 4,55$; $p<0,05$; Fig. 3A). Las estaciones se separaron en dos grupos homogéneos; el primero formado por las estaciones 2 y 3, el cual presentó los valores más altos; y el segundo formado por las estaciones 3 y 4, con los valores más bajo. En cuanto a la variación temporal de la transparencia, se detectó una tendencia al alza. En general, los valores tendieron a aumentar hasta el final del estudio. Se encontraron diferencias significativas ($Kw= 2,96$; $p<0,05$; Fig. 3B). Sin embargo, no se detectó una clara separación de grupos. Esto podrían clasificarse de la siguiente manera, un grupo con las transparencias más bajas formada por los días (38, 74, 116 y 172) y otro grupo con transparencias mas altas (172, 194, 129, 243, 262 306).

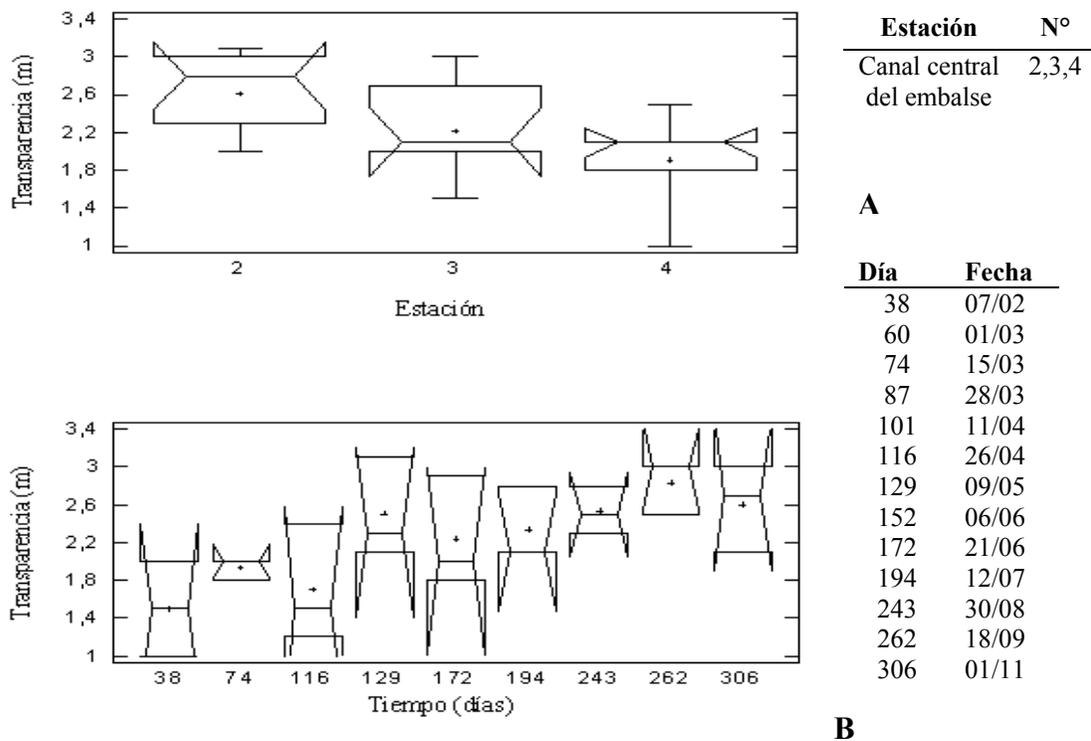


Figura 3. Variación espacial (A) y temporal (B) de la transparencia del agua (m) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

La temperatura no mostró diferencias espaciales significativa ($K_w = 0,11$; $p > 0,05$; Fig. 4A). Sin embargo, sí varió significativamente con respecto al tiempo ($K_w = 11,65$; $p < 0,05$; Fig. 4B). El valor tendió a aumentar a medida que avanzó el estudio. El análisis permitió separar cinco grupos homogéneos, de los cuales, el primero con las temperaturas mas bajas y está integrado por los días (17, 38, 60, 74, 87), el segundo y tercer grupo están conformados por los días con las temperaturas intermedias (101, 116, 129, 152, 172, 174 y 243, respectivamente) y el último grupo con las temperaturas mas altas (243, 262, 306).

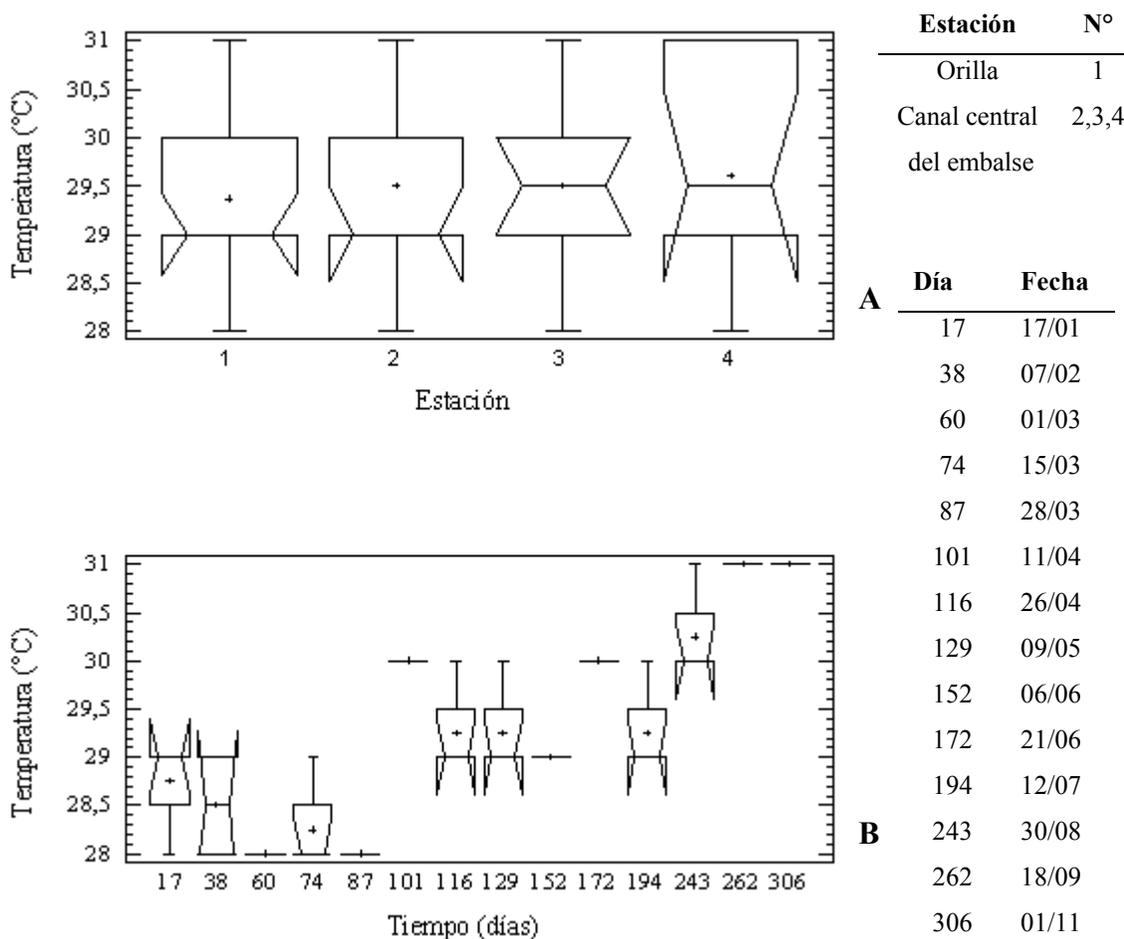


Figura. 4 Variación espacial (A) y temporal (B) de la temperatura (°C) del agua medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre de 2007.

VARIABLES QUÍMICAS

No se detectaron diferencias significativas en el pH ($K_w = 0,13$; $p > 0,05$; Fig. 5A). Sin embargo, se apreciaron diferencias significativas con respecto al tiempo, ($K_w = 3,22$; $p < 0,05$; Fig. 5B). El pH aumentó progresivamente desde el día 17 hasta el 116, luego disminuyó entre los días 129 y 152. Posteriormente, se incrementó el valor para alcanzar el máximo del estudio (8,70 unidades) el día 172, a partir de este muestreo, el pH disminuyó hasta alcanzar el valor de 7,96 unidades.

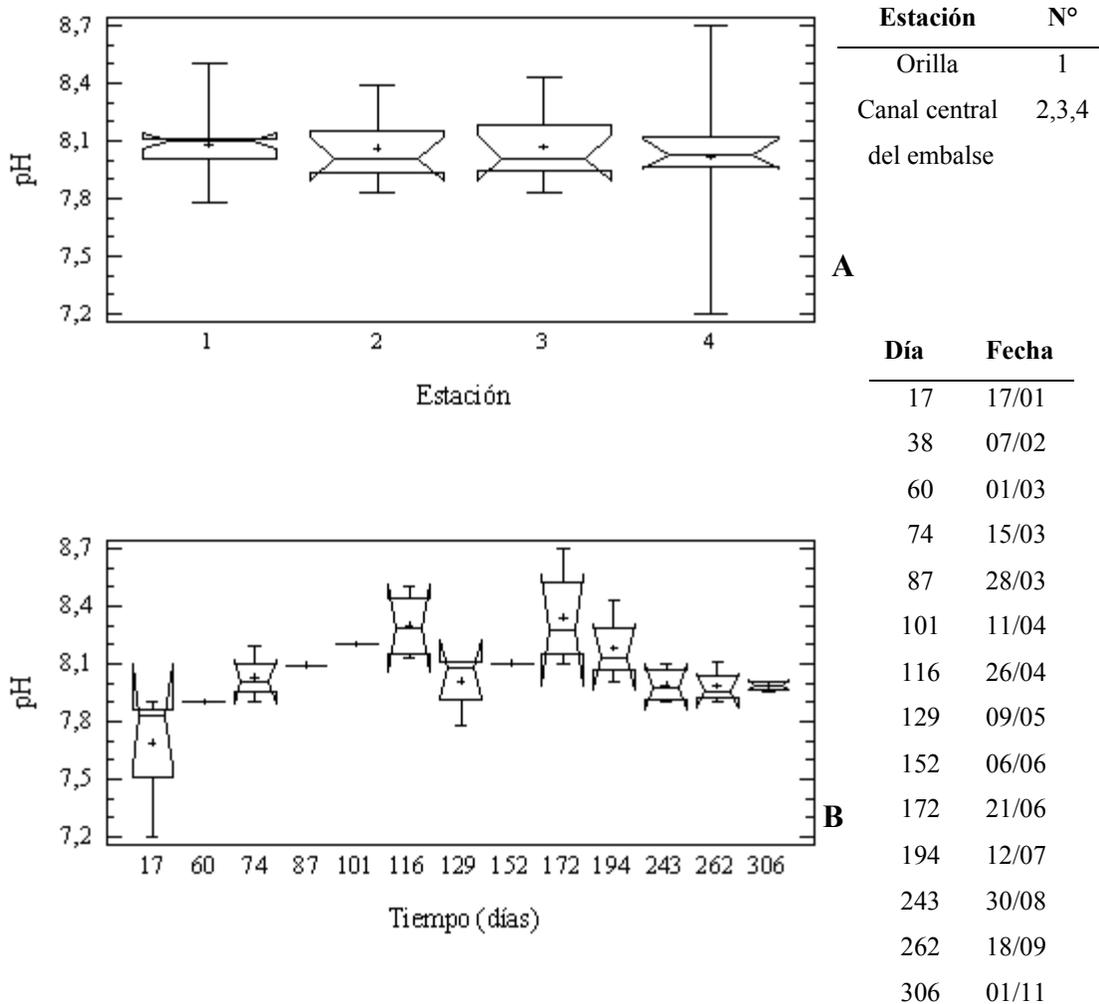


Figura 5. Variación espacial (A) y temporal (B) de pH del agua medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

La variación espacial de la concentración de oxígeno disuelto fue similar en las cuatro estaciones ($K_w = 0,11$; $p > 0,05$; Fig.6A). Sin embargo, se estableció que esta variable presentó diferencias significativas con respecto al tiempo ($K_w = 21,45$; $p < 0,05$; Fig. 6B). Se determinó un descenso de la concentración de oxígeno disuelto, desde el día 17 hasta el 74; luego, aumentó con ligeras variaciones durante los días 87 y 101. El valor se mantuvo relativamente estable durante el resto de estudio, a excepción del día 262 cuando aumentó de nuevo hasta alcanzar $12,43 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ el valor más alto del estudio.

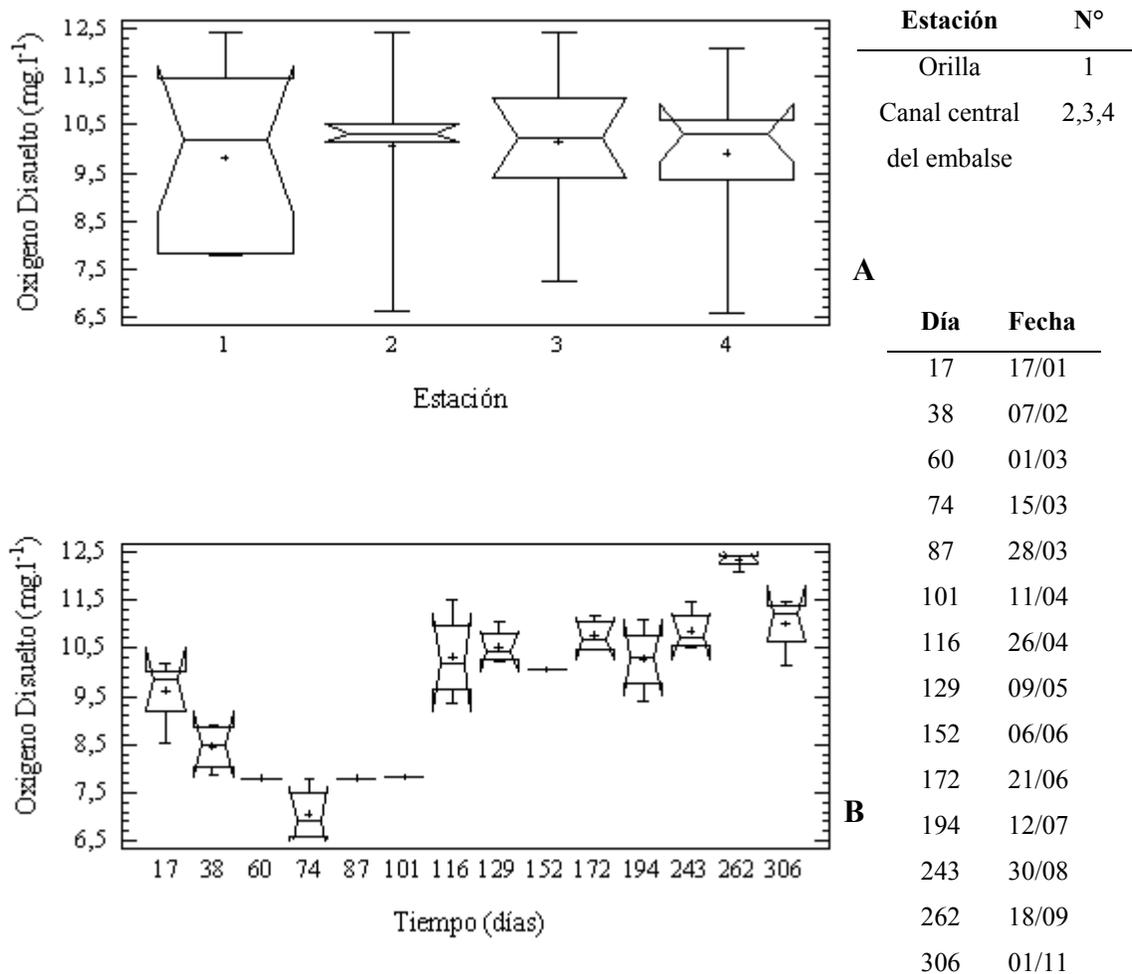


Figura 6. Variación espacial (A) y temporal (B) del oxígeno disuelto en el agua ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

La distribución espacial de la concentración de amonio no presentó diferencias significativas con respecto a las estaciones ($K_w = 1,97$; $p > 0,05$; Fig. 7A). Sin embargo, en la distribución temporal si hubo diferencias significativas ($K_w = 6,85$; $p < 0,05$; Fig. 7B). Se observaron valores muy similares durante los días 17- 38 y 74-172, los cuales no superaron el valor de $0,55 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que el día 60, se incremento la concentración de 0,37 a $1,73 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Además, un ligero aumento durante el día 194, alcanzando una concentración de $0,68 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ para luego descender este valor hasta el final del estudio.

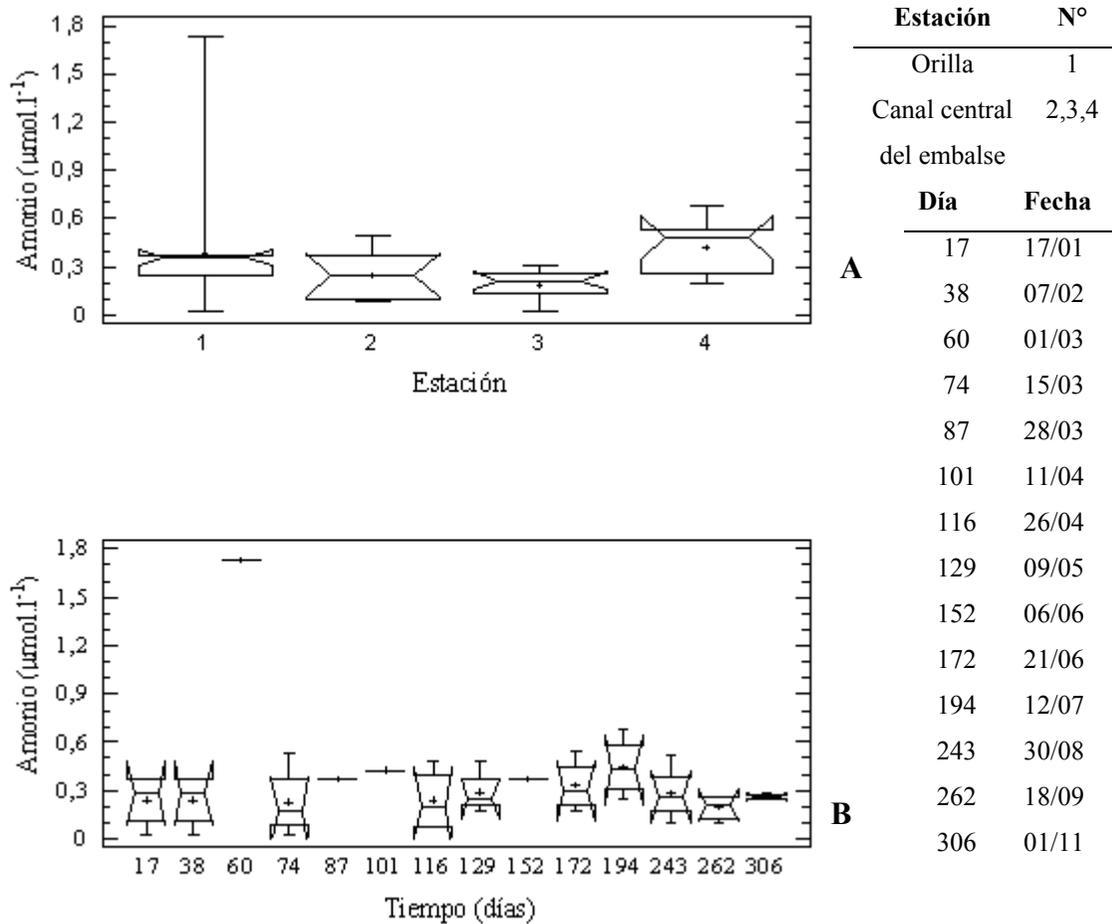


Figura 7. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de amonio ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y Noviembre del 2007.

La concentración de nitrito no presentó variaciones espaciales significativas ($K_w = 0,06$; $p > 0,05$; Fig. 8A), mientras que la distribución temporal sí varió significativamente ($K_w = 61,92$; $p < 0,05$; Fig. 8B). Se encontraron valores similares durante los días 17 y 38, incrementándose, hasta alcanzar el máximo de $0,77 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ detectado el día 60. Seguidamente, se observaron valores más bajos que los iniciales; es decir, menores a $0,69 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, para los días 74-101 y 125-306. Para los días 116 y 129 se detectó un aumento en los valores registrados, sin superar los máximos obtenidos previamente.

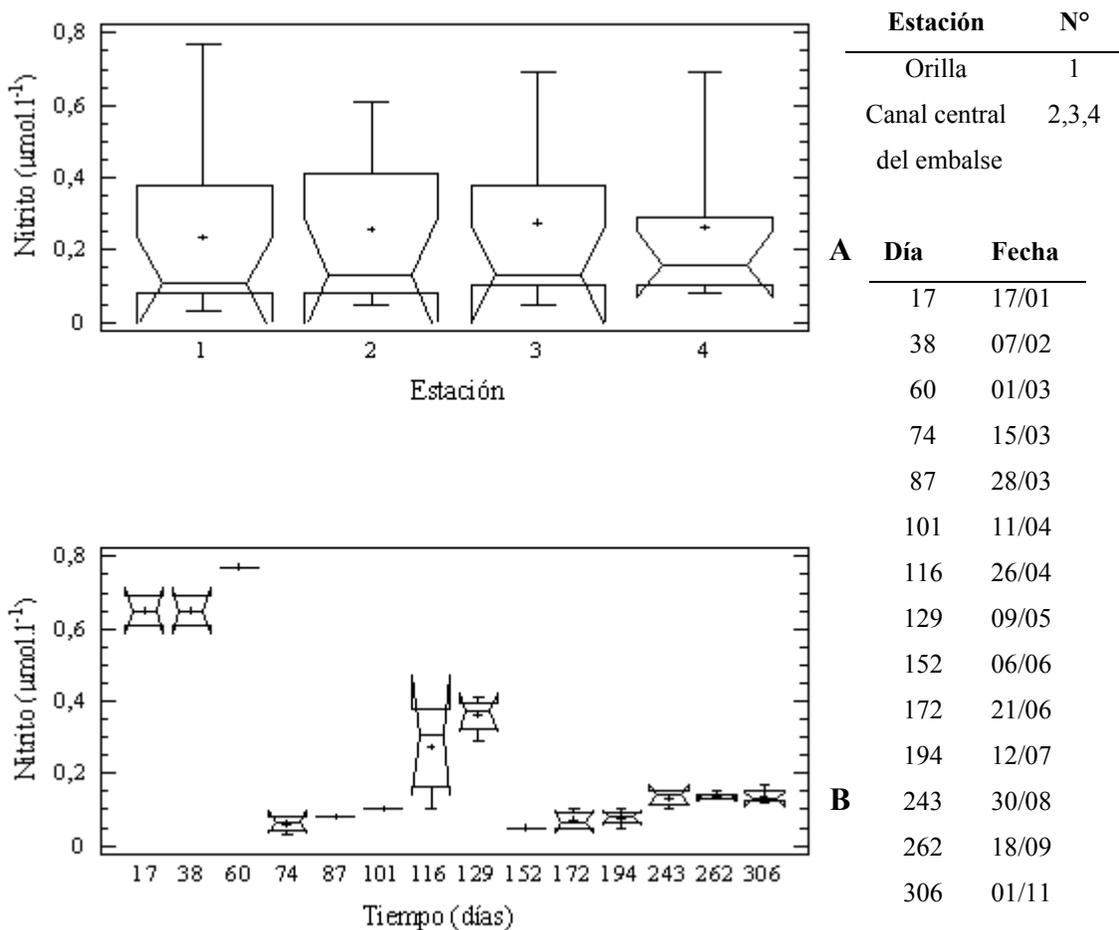


Figura 8. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de nitrito ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la variación espacial de la concentración de nitrato ($K_w = 1,38$; $p > 0,05$; Fig. 9A). Sin embargo, se registraron diferencias significativas en la variación temporal ($K_w = 3,44$; $p < 0,05$; Fig. 9B). La concentración de este nutriente estuvo entre $0,07$ y $0,81 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, excepto los días 17 y 74 con $3,31$ y $6,71 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente, los cuales fueron valores altos con respecto al resto.

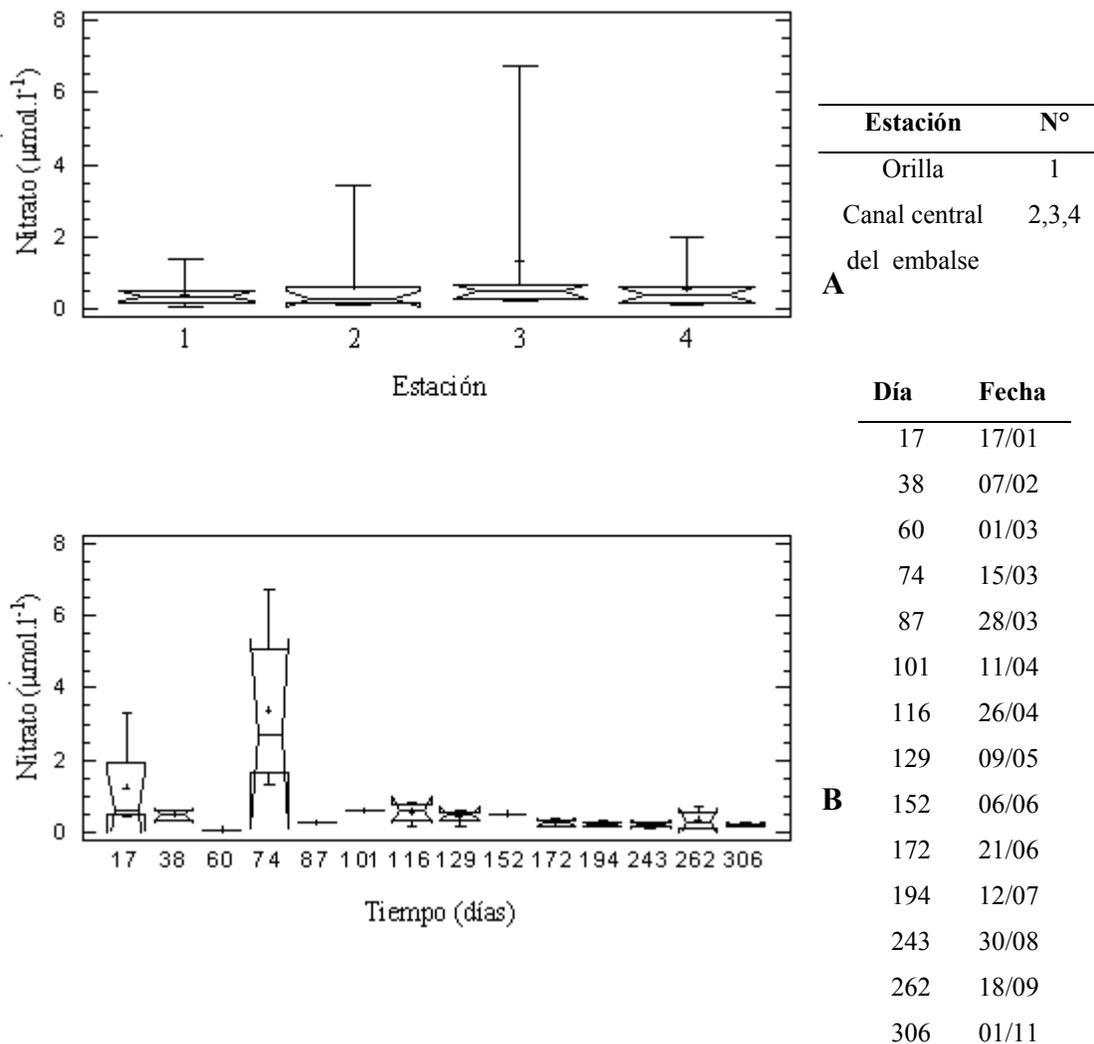


Figura 9. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de nitrato ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

La concentración de nitrógeno total no varió de forma significativa, con respecto a las estaciones ($K_w = 0,24$; $p > 0,05$; Fig. 10A), pero sí con respecto al tiempo ($K_w = 11,5$; $p < 0,05$; Fig. 10B). Se detectó un aumento sostenido en los valores, exceptuando los días 152, 172 y 194, cuando se observaron algunas fluctuaciones. Los valores máximos fueron $36,34$ y $37,04 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y se detectaron en los días 243 y 262, respectivamente, para finalmente disminuir el día 306 a $32,17 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

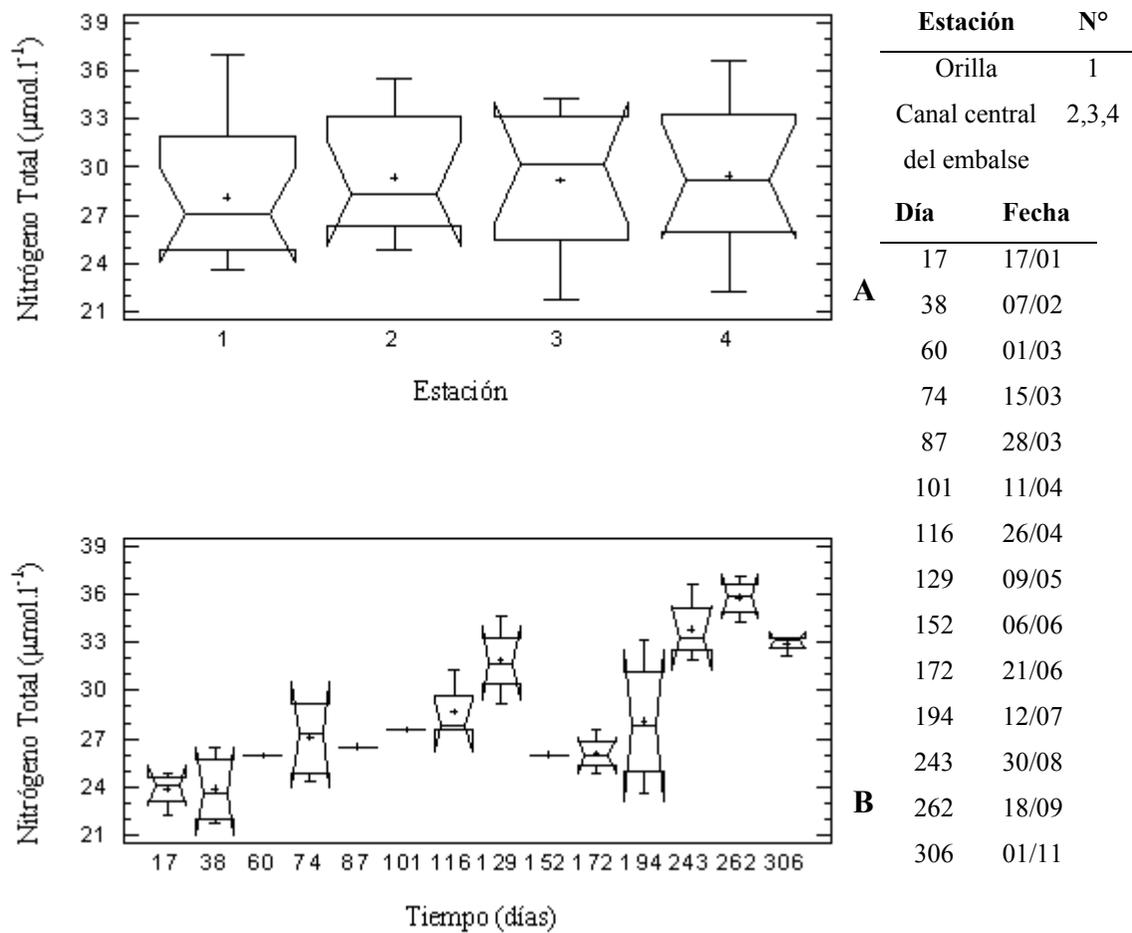


Figura 10. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de nitrógeno total ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

No se detectaron variaciones espaciales significativas en la concentración de

fosfato ($K_w = 0,92$; $p > 0,05$; Fig. 11A). Sin embargo, los valores sí variaron de manera significativa con respecto al tiempo ($K_w = 11,65$; $p < 0,05$; Fig. 11B). El día 17 se registró el máximo valor ($0,43 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) y luego la concentración disminuyó hasta el día 60 ($0,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); durante los días 87-243, los valores fueron similares, a excepción de los dos últimos días del estudio cuando la concentración de fósforo resultó aumentar, pero de manera no significativa, sin llegar a superar el máximo detectado previamente.

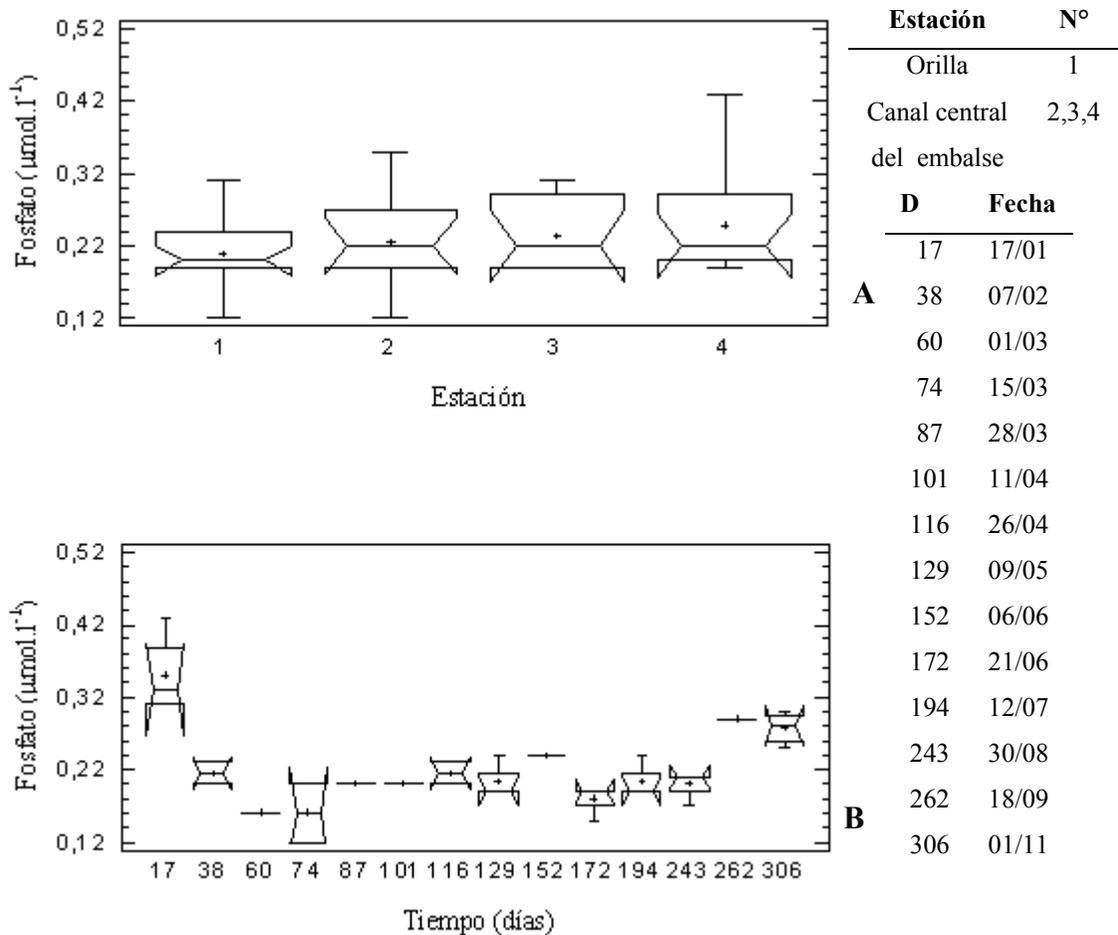


Figura 11. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de fosfato ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) Medido en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

Se registraron diferencias espaciales y temporales en la concentración de fósforo total ($K_w = 0,09$ y $K_w = 3,93$; $p < 0,05$; Fig. 12). Las concentraciones aumentaron, con algunas fluctuaciones. El día 116 alcanza el valor de $0,79 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ el cual resultó ser la máxima concentración obtenida durante todo el estudio, para luego descender los días 129 y 152, registrando el mínimo valor este último día. Posteriormente, la concentración aumentó y se mantuvo alrededor de $0,50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hasta final del estudio.

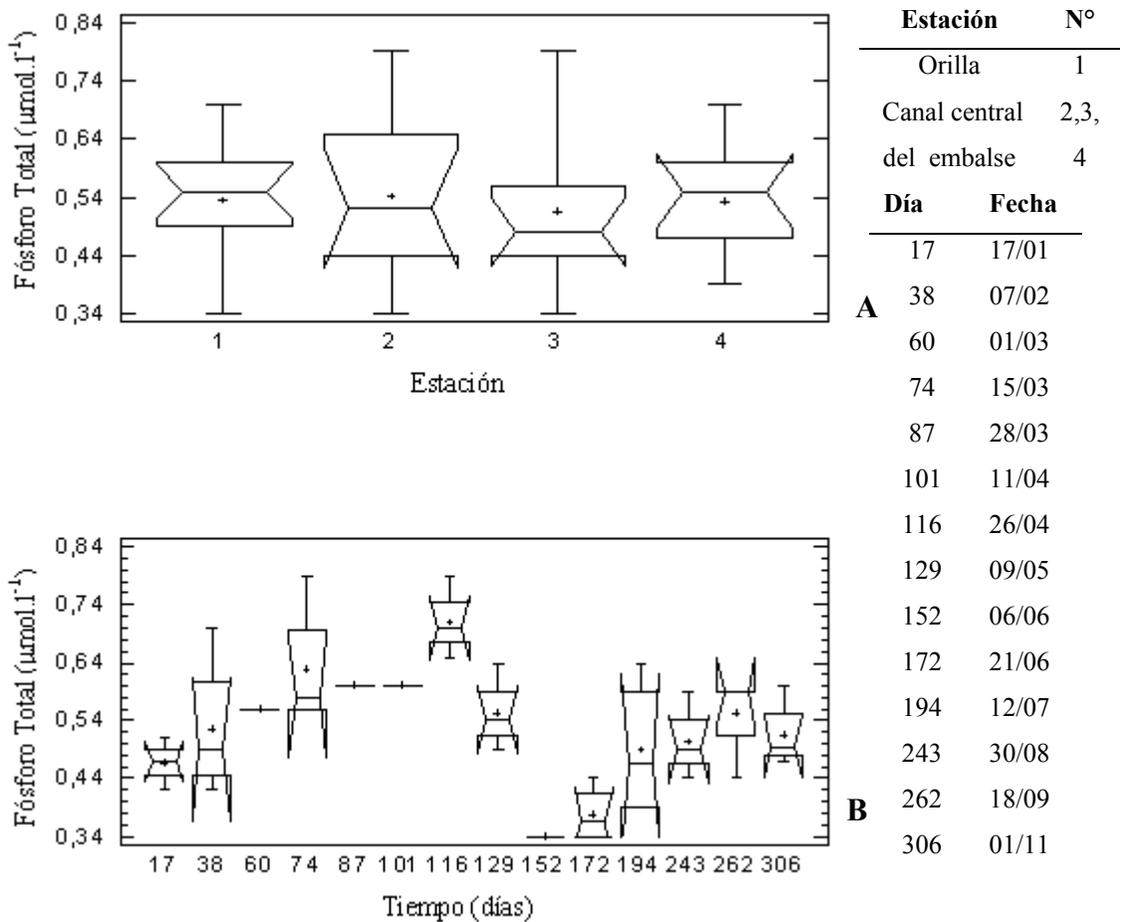


Figura 12 Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de fósforo total ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007.

VARIABLES BIOLÓGICAS

No se encontraron diferencias espaciales significativas en la concentración de chl *a* ($K_w = 0,21$; $p > 0,05$; Fig. 12A). Sin embargo, sí se detectaron diferencias temporales significativas ($K_w = 15,55$; $p < 0,05$; Fig. 12B). Se observó una disminución del valor obtenido entre el día 17, hasta un valor no detectable el día 87. Entre los días 101 y 172 la concentración tiende a mantenerse estable. Posteriormente, se midió el mayor valor del estudio ($55, 53 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) el día 194, a partir de este día los valores fueron inferiores a $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

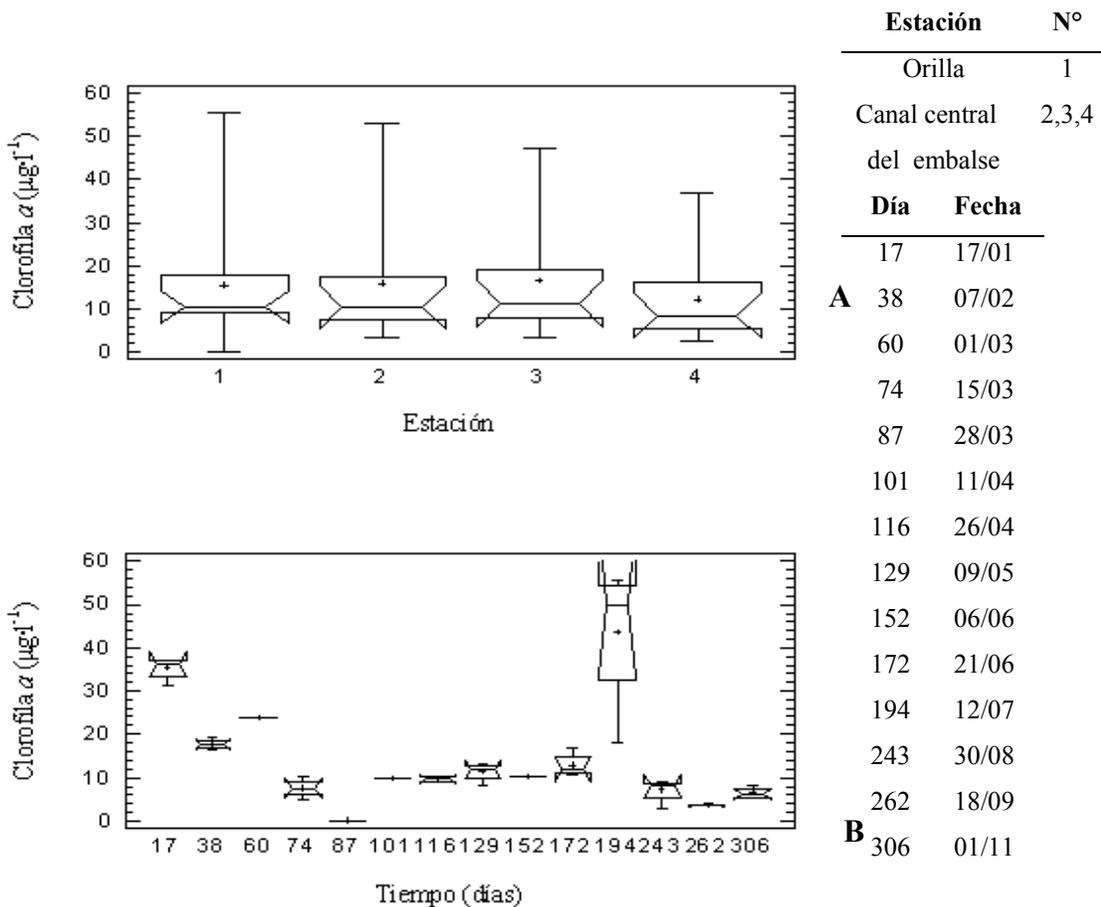


Figura 13. Variación espacial (A) y temporal (B) de la concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) medida en el embalse Clavellino (Edo. Sucre), entre enero y noviembre del 2007

La abundancia de cianobacteria mostró, en general, una tendencia al alza, con algunas fluctuaciones durante el estudio, como la observada durante el día 129 (09/05/07), cuando la abundancia de estos organismos descendió abruptamente (Figura 14). El valor mas alto ($4,98 \times 10^2 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$) se midió en la estación 3, durante la época de lluvia, el día 262 (18/09/07), mientras que en las muestras restantes los valores oscilaron entre 0 y $4,41 \times 10^2 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Con respecto a la distribución espacial, las mayores concentraciones de cianobacterias se registraron en la estación 3.

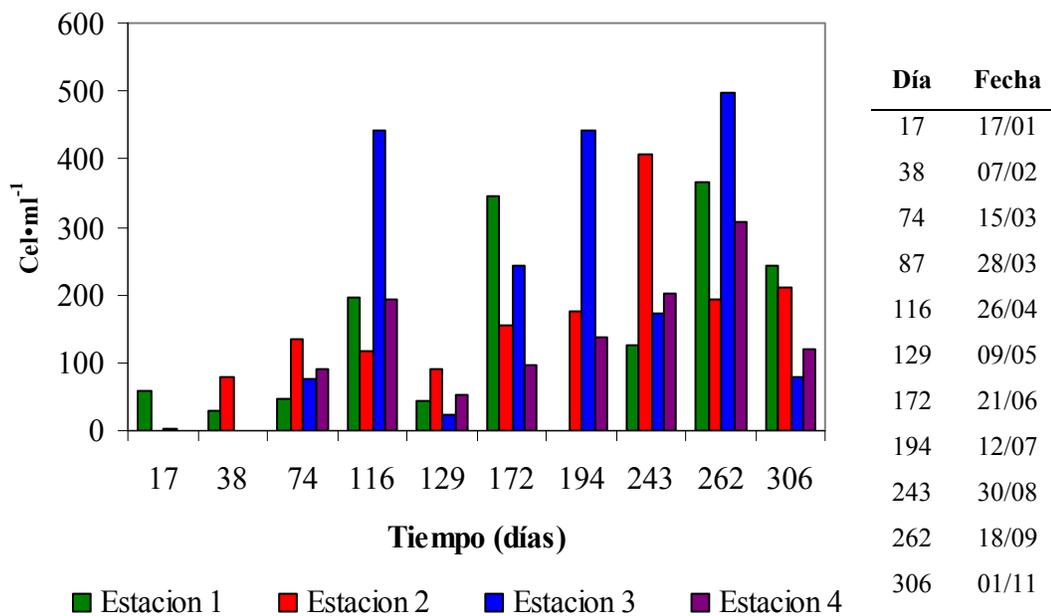


Figura 14. Abundancia de las cianobacterias en el embalse Clavellino.

Se identificaron 21 especies de cianobacterias (tabla 3). De éstas, *Anabaena* sp., *Chroococcus* sp., *Merismopedia* sp., y *Microcystis* sp. fueron las microalgas dominantes en las muestras. Es importante resaltar que *Anabaena* sp. y *Microcystis* sp. son las principales especies productoras de toxinas (Amé *et al.*, 2003). Estas especies productoras de toxinas presentaron su mayor abundancia el día 262 (18/09/07), con $76 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, para la *Anabaena* sp. y $38 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *Microcystis* sp.

Tabla. 3 Cianobacterias identificadas durante el estudio.

Cianobacterias Identificadas		
<i>Anabaena</i> sp.	<i>Chroococcus turgidus</i>	<i>Microcystis</i> sp.
<i>Anabaenopsis</i> sp.	Colonia de cianobacteria	<i>Microcystis</i> sp. 2
<i>Arthrospira</i> sp.	Filamento cianobacteria	<i>Oscillatoria</i> sp.
<i>Calothrix</i> sp.	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Raphidiopsis</i> sp.
<i>Cianobacteria unicelular</i>	<i>Merismopedia</i> sp.	<i>Schizothrix calcicola</i>
<i>Chroococcus</i> sp. pequeño	<i>Microcystis aeruginosa</i>	
<i>Chroococcus</i> sp.	<i>Microcystis</i> sp. colonia	
<i>Chroococcus</i> sp. 2	<i>Microcystis</i> sp. pequeña	

Tabla 4. Cianobacterias más abundantes identificadas durante el estudio.

Organismo	Días									
	17	38	74	116	129	172	194	243	262	306
Estación 01										
<i>Anabaena</i> sp.	X	X	X		X	X		X	X	X
<i>Chroococcus</i> sp.	X					X			X	X
<i>Chroococcus turgidus</i>		X	X							
<i>Merismopedia</i> sp.				X	X	X		X	X	X
<i>Microcystis</i> sp.		X	X		X	X			X	X
<i>Oscillatoria</i> sp.		X				X				X
Estación 02										
<i>Anabaena</i> sp.		X	X		X	X		X	X	X
<i>Chroococcus</i> sp.	X					X	X	X	X	X
<i>Chroococcus turgidus</i>		X	X		X					
<i>Merismopedia</i> sp.			X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Microcystis</i> sp.		X	X	X	X		X	X		X
<i>Oscillatoria</i> sp.										X

Estación 03

<i>Anabaena</i> sp.	X				X				X	X
<i>Chroococcus</i> sp.					X	X	X	X		X
<i>Chroococcus turgidus</i>										
<i>Merismopedia</i> sp.			X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Microcystis</i> sp.			X		X	X	X			
<i>Oscillatoria</i> sp.										

Estación 04

<i>Anabaena</i> sp.		X	X	X	X			X	X	X
<i>Chroococcus</i> sp.				X		X	X	X	X	X
<i>Chroococcus turgidus</i>			X	X						X
<i>Merismopedia</i> sp.					X	X	X	X	X	X
<i>Microcystis</i> sp.			X	X	X		X		X	
<i>Oscillatoria</i> sp.										

X= cianobacteria presente

La estación 1 presentó valores constantes, durante el inicio del estudio, los cuales aumentaron, con algunas fluctuaciones, después del día 172 (21/06/2007). Además, hubo la mayor presencia de cianobacterias del género *Anabaena* sp., seguida de la *Microcystis* sp. y *Merismopedia* sp. (tabla 4), las cuales fueron las mas abundantes durante todo el estudio. Cabe destacar que la misma presentó la mayor abundancia fitoplactonica durante el estudio. Sin embargo, en la estación 2 el crecimiento en la abundancia fue casi sostenido, con algunas excepciones, como el día 129 (09/05/2007) cuando la abundancia de las cianobacterias descendió de manera abrupta en todas las estaciones. También se observó la superioridad del género *Merismopedia* sp., con muy poca diferencia sobre las especies anteriormente mencionadas, pero, de igual manera, estuvieron presente en casi todo el estudio. La estación 3 mostró valores bajos al inicio del estudio. Sin embargo, aumentó de

manera abrupta en tres ocasiones, alcanzando valores parecidos en las tres oportunidades, los días 116 (26/04/2007), 194 (12/07/2007) y 262 (18/09/2007), en este último se encontró la mayor abundancia de cianobacterias durante todo el estudio, con un máximo de 498 cel·ml⁻¹, de la cual su mayoría perteneció al género *Merismopedia* sp., detectándose así una baja significativa de la presencia de los géneros *Anabaena* sp. y *Microcystis* sp. La presencia del género *Merismopedia* fue el doble que las mencionadas anteriormente. La estación 4 presentó un crecimiento sostenido, con algunas fluctuaciones, con respecto a la abundancia, mostrando, así, su máximo valor el día 262 (18/09/2007). Estuvo dominada por el género *Anabaena* sp. seguido de la *Merismopedia* sp y la *Microcystis* sp.

BIOENSAYO DE TOXICIDAD

Actividad tóxica en *Artemia salina* sp.

Solamente ocho de los extractos resultaron ser tóxicos para los nauplios de *A. salina* (Tabla 5). Estos extractos provenían de: la estación 01, los días 129, 172, 194 y 243; de la estación 02, solamente el día 192; de la estación 03, el día 172 y, finalmente, los extractos provenientes de la estación 04, de los días 38 y 129. Todos ellos mostraron una toxicidad del 100%, a una concentración de 1000 ppm, excepto el preparado con la muestra proveniente de la estación 04 del día 38. Sin embargo, para la concentración de 10 ppm los extractos provenientes de las estaciones 01 de los días 129, 172 y 243 resultaron tóxicos, de igual manera para esta misma concentración, el extracto proveniente de la estación 04 del día 129. Por último, a la concentración de 1 ppm solamente se observó toxicidad en la estación 01 correspondiente al día 129.

Tabla 5. Actividad toxica de los extracto de cianobacterias en metanol en *A. salina* en las estaciones ubicadas en el embalse Clavellino desde enero hasta noviembre de 2007.

Numero de nauplios muertos a cada concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)									
Fecha	Estación	Replica	1000	100	10	1	0,1	0,01	Control
38 07/02	04	1	10	0	0	0	0	0	0
		2	10	0	0	0	0	0	0
		3	10	0	0	0	0	0	0
129 09/05	01	1	10	8	6	3	0	0	0
		2	10	9	5	3	0	0	0
		3	10	8	4	3	0	0	0
172 21/06	04	1	10	9	3	0	0	0	0
		2	10	9	3	0	0	0	0
		3	10	9	4	0	0	0	0
194 12/07	01	1	10	8	5	0	0	0	0
		2	10	7	8	0	0	0	0
		3	10	9	7	0	0	0	0
243 30/08	03	1	10	6	0	0	0	0	0
		2	10	5	0	0	0	0	0
		3	10	6	0	0	0	0	0
243 30/08	01	1	10	3	0	0	0	0	0
		2	10	3	0	0	0	0	0
		3	10	3	0	0	0	0	0
243 30/08	02	1	10	7	0	0	0	0	0
		2	10	6	0	0	0	0	0
		3	10	7	0	0	0	0	0
243 30/08	01	1	10	9	5	0	0	0	0
		2	10	9	3	0	0	0	0
		3	10	9	5	0	0	0	0

El valor de la CL_{50} demostró que solamente los extractos provenientes de la estación 01, correspondientes a los días 129, 172 y 243, mientras que la estación 04, el día 129 resultaron ser tóxicos según (Meyer, 1982), la cual debe tener una concentración $<30 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, el extracto mas tóxico fue el obtenido en la estación 01 el día 129 (09/05/07). Esto se logro con un ajuste Probit, el cual a su vez resulto ser el 12,5% de los valores con el intervalo de mayor confianza, el Binomial con un 50% y Moving Average con 37,5%.

Tabla 6. Valores de CL_{50} obtenidos a partir del bAs en las estaciones ubicadas en el embalse Clavellino desde enero hasta noviembre de 2007.

Fecha	Estación	Método	LC₅₀	Inferior	Superior
38		Binomial*	316,00	100	1000,00
07/02	04	Moving Average	-	-	-
		Probit	-	-	-
		Logit	681,26	0,00	∞
		Binomial	10,00	1,00	1000,00
	01	Moving Average	7,77	4,16	15,44
		Probit*	7,41	3,93	14,04
129		Logit	6,88	3,25	14,74
09/05		Binomial	18,64	10,00	100,00
	04	Moving Average*	17,98	11,57	29,66
		Probit	18,76	11,67	30,12
		Logit	15,43	3,32	87,14
		Binomial	6,44	1,00	100,00
	01	Moving Average*	9,70	6,04	15,53
		Probit	10,17	6,06	17,10
172		Logit	6,24	0,88	25,72
21/06		Binomial*	100,00	1,00	1000,00

	03	Moving Average	-	-	-
		Probit	-	-	-
		Logit	93,10	0	∞
		Binomial*	166,91	1,00	100,00
	01	Moving Average	-	-	-
		Probit	-	-	-
194		Logit	333,27	0,00	∞
12/07		Binomial*	64,39	1,00	100,00
	02	Moving Average	-	-	-
		Probit	-	-	-
		Logit	40,61	0,82	3073,30
243		Binomial	13,41	1,00	1000,00
30/08	01	Moving Average*	14,70	9,47	23,73
		Probit	15,21	9,34	24,75
		Logit	11,57	3,65	36,81

* Valor de CL₅₀ más confiable

DETERMINACIÓN DE MICROCISTINAS USANDO HPLC-UV

Con las condiciones cromatográficas, seleccionadas para este estudio, se procedió a hacer las corridas de los patrones. El patrón de microcistina R-R, a la concentración de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mostró una señal cromatográfica a un tiempo de retención de 8,31 min (Fig. 15A), mientras que las concentraciones de 125 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se observaron señales a 8,40 y 9,05 min. (Apéndice A), respectivamente. El patrón de microcistina L-R mostró una señal a una concentración de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y a un tiempo de retención de 4,13 min (Fig. 16B) y a concentraciones de 125, 62,5 y 15,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ mostró señales a 3,44 y 4,77 min, respectivamente (Apéndice B). La variación en los tiempos de retención para cada uno de los patrones dependió de la

mezcla de la fase móvil la columna y la presión de la bomba.

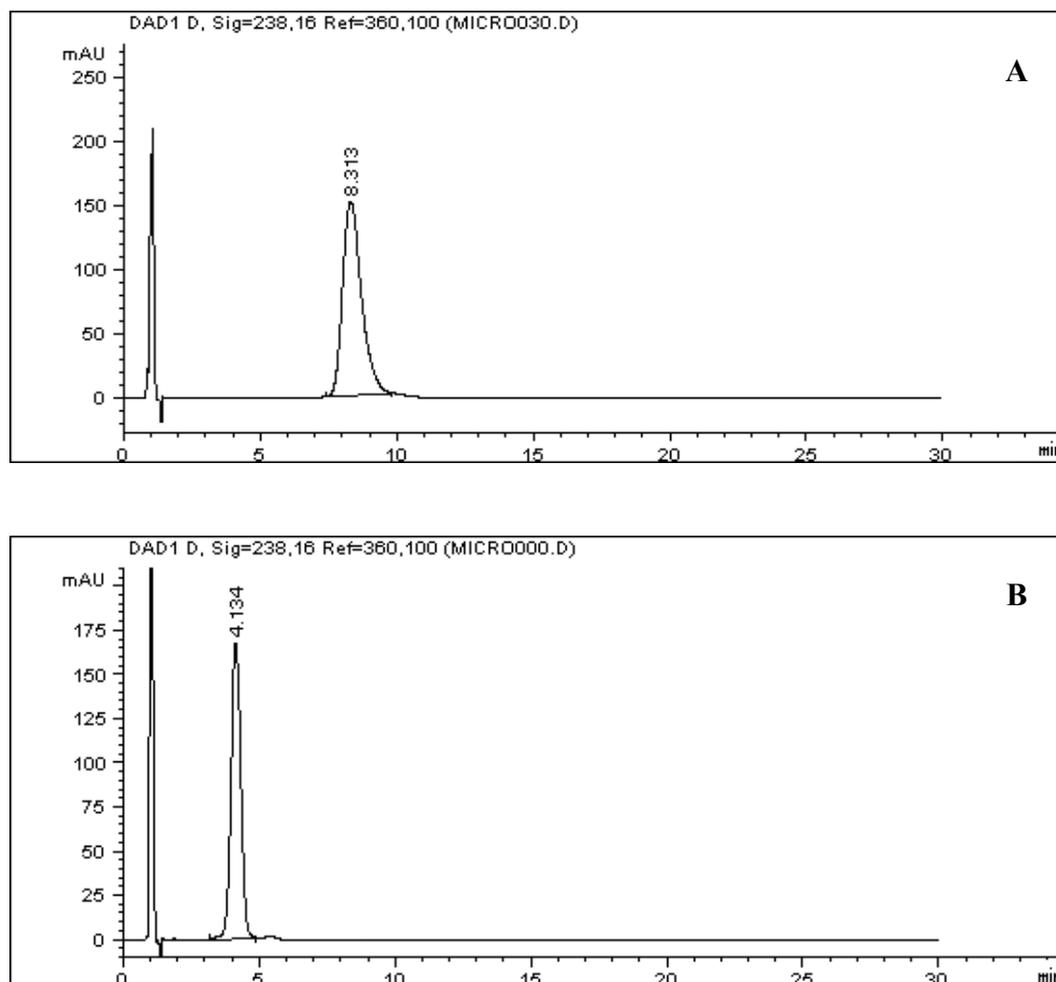


Figura 15. Cromatograma obtenido del patrón de microcistina R-R (A) y L-R (B) a una concentración de $250\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Se evaluó la linealidad del método empleado para la determinación de microcistinas. La curva de calibración es la más simple comprobación de la calidad de respuesta (Hubert *et al.*, 1999). La curva se realizó con tres patrones de microcistinas R-R de concentración $250, 125, 50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figura 16). Se calculó el coeficiente de correlación (R^2) y la ecuación de regresión lineal, obteniéndose un

valor de 0,9974, lo que indica que la curva tiene un comportamiento lineal y tiene una baja dispersión de valores. De igual manera, se realizó la curva de calibración para la microcistina L-R usando patrones con concentraciones de 250, 125, 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, (Figura 17) obteniéndose un valor de R^2 de 0,9995 el cual es bastante aceptable.

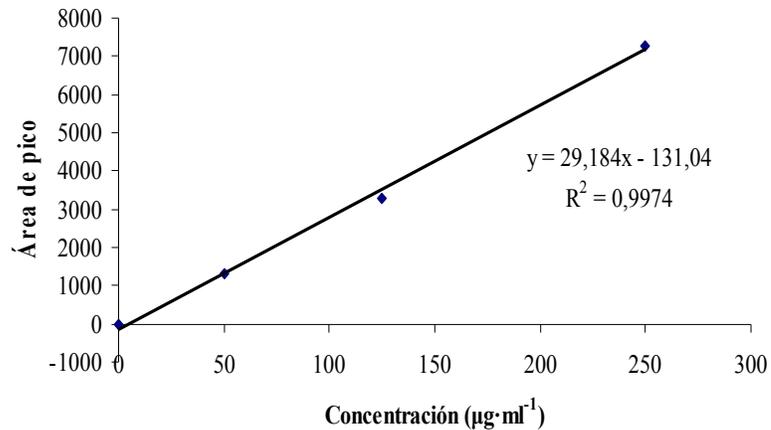


Figura 16. Curva de calibración de la microcistina R-R usando HPLC con detector UV.

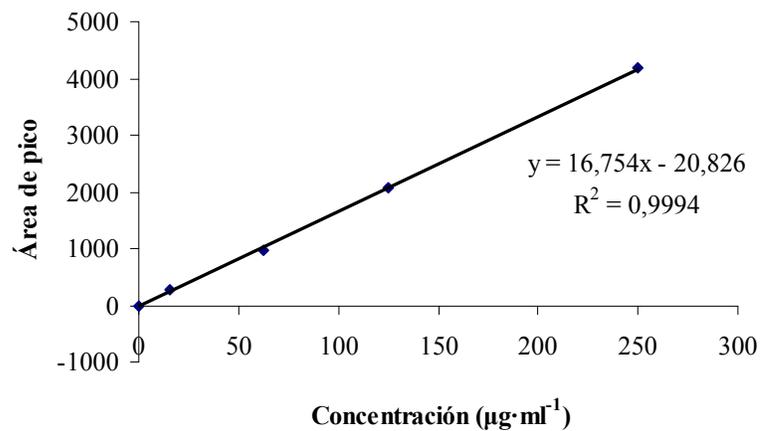


Figura 17. Curva de calibración de la microcistina L-R usando HPLC con detector UV.

De las microcistinas medidas, se detectó la presencia de las microcistinas L-R y R-R. La microcistina R-R solamente se detectó en el extracto correspondiente a la

estación 04 del día 38 (07/02/07), con una señal a un tiempo de retención de 8,36 min (Fig. 18). Este tiempo coincide con el intervalo obtenido por el patrón de microcistina R-R. Sin embargo, la microcistina L-R se detectó en siete oportunidades. Los extractos provenientes de la estaciones 01 y 04 del día 129 (09/05/07) presentaron señales a 3,04 y 3,04 min (Fig. 19A y B), respectivamente, de igual manera, los extractos provenientes de la estación 01 del día 172 (21/06/07) presentó una señal a tiempo de retención de 3,04 min (Fig. 19C) mientras que la estación 03 para la misma fecha mostró una señal a 3,52 min (Fig. 20A), así también, los cromatogramas resultantes de los extractos obtenidos de las estaciones 01 y 02 del día 194 (12/07/07), presentaron varias señales, de las cuales las obtenidas a tiempos de 3,03 y 3,02 min (Fig. 20B y C), respectivamente, corresponden con los patrones de microcistina L-R. Sin embargo, para el día 243 (30/08/07), solamente se detectó la presencia de microcistinas en la estación 03, con una señal a 3,03 min, característico de esta toxina (Fig. 21).

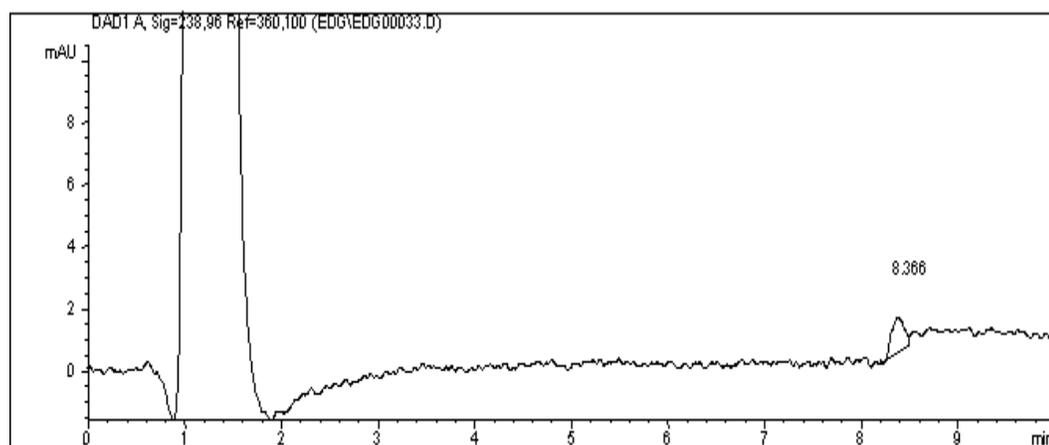


Figura 18. Cromatograma de microcistina R-R extraída con ácido acético al 5%. Muestra colectada en la estación 04 (embalse Clavellino) el 07/02/2007.

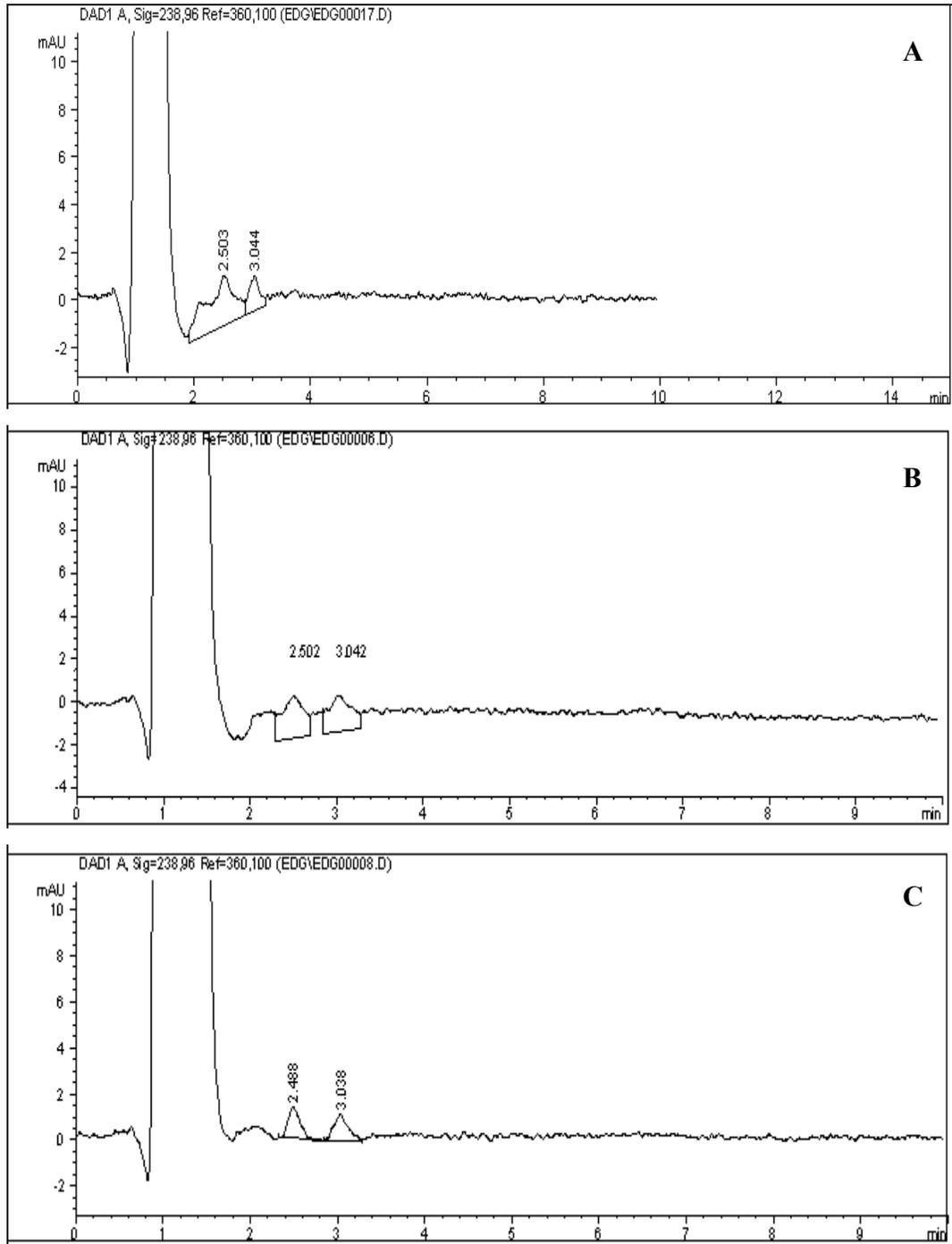


Figura 19. Cromatogramas de microcistina L-R extraídas con ácido acético al 5%. A y B, muestras colectadas en las estaciones 01 y 04 el 09/05/2007; y C muestra colectada en la estación 01 el 21/06/2007 (embalse Clavellino).

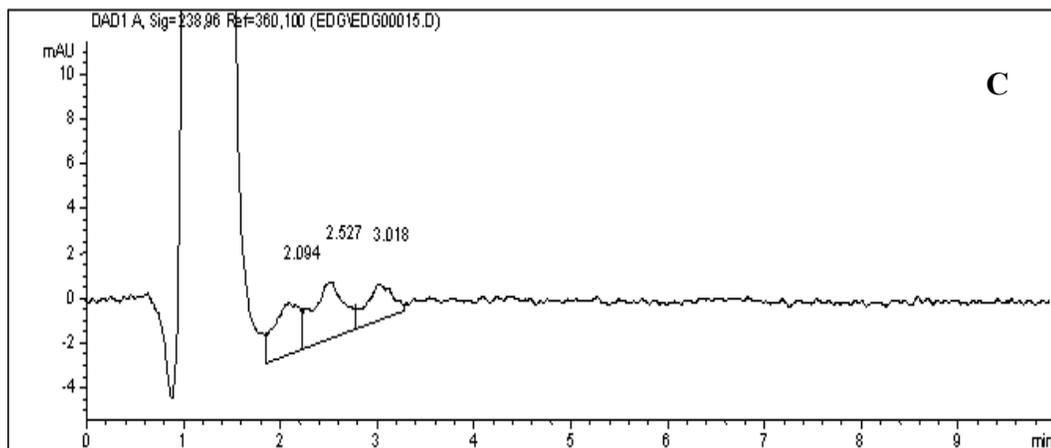
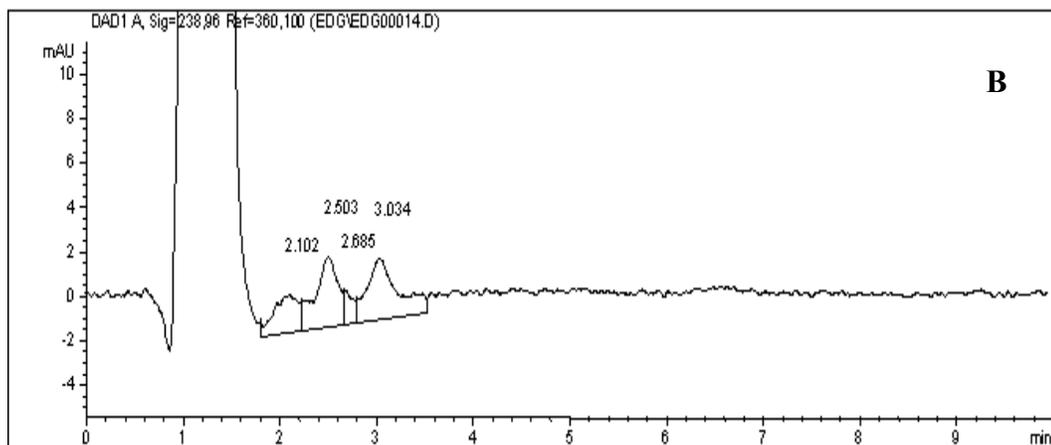
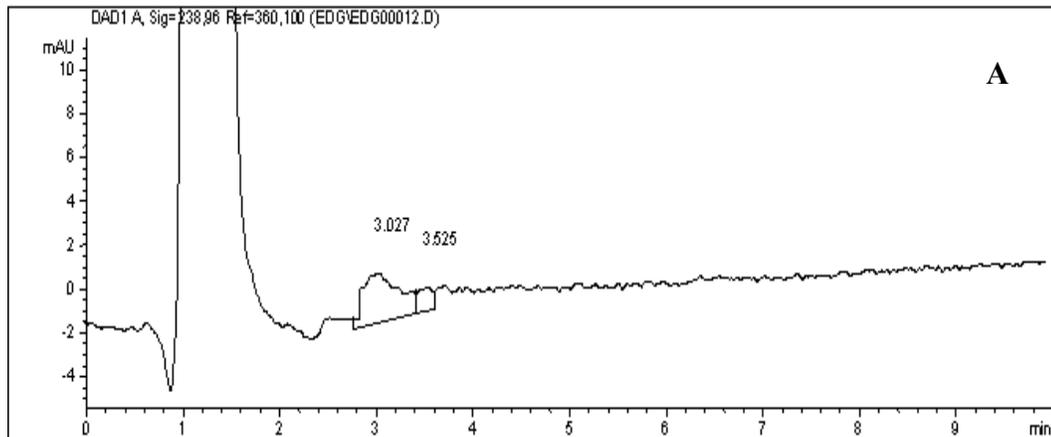


Figura 20. Cromatogramas de microcistina L-R extraídas con ácido acético al 5%. A, muestra colectada en la estación 03 el 21/06/2007; B y C, muestras colectadas en las estaciones 01 y 02 el 12/07/2007 (embalse Clavellino).

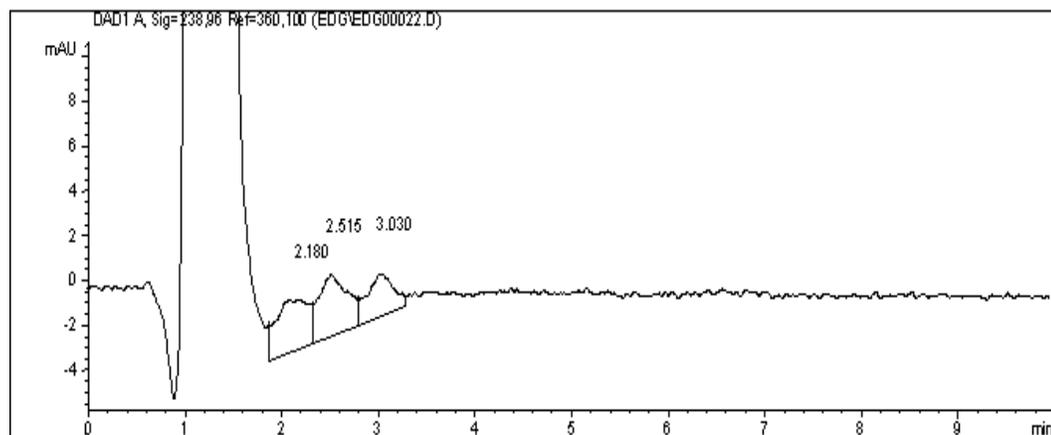


Figura 21. Cromatograma de microcistina L-R extraída con ácido acético al 5%. Muestra colectada en la estación 03 (embalse Clavellino) el 30/08/2007.

Tabla 7. Concentración de las microcistinas R-R y R-L en muestras de agua del embalse Clavellino, Edo. Sucre, usando HPLC con detector de UV.

Toxina	Fecha	Estación	Concentración $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
R-R	07/02/2007	04	0,140
Toxina	Fecha	Estación	Concentración $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
L-R	09/05/2007	01	1,808
L-R	09/05/2007	04	0,549
L-R	21/06/2007	01	0,630
L-R	21/06/2007	03	0,346
L-R	12/07/2007	01	0,880
L-R	12/07/2007	02	0,542
L-R	30/08/2007	03	0,629

Análisis de componentes principales (ACP)

El ACP de las variables estudiadas mostró una varianza acumulada de 50,76 % para los dos primeros componentes. En el primer componente se observa una correlación positiva entre la variación de la abundancia de *Anabaena* sp, y la

temperaturas además, una relación inversa de la concentración de nitrógeno total con la variación de la concentración de clorofila a en el mismo componente. La concentración de fosfato, ubicada en el segundo componente, presento una correlación negativa con respecto a la concentración de microcistina L-R y la variación en la abundancia de *Microcystys* sp. mientras que las dos ultima mostraron una correlación positiva entre si.

Tabla 8. Porcentajes de la variancia total explicada por los tres primeros componentes del ACP de las variables medidas en el embalse clavellino, enero – noviembre de 2007.

Numero de componente	Valor	Variancia	Porcentaje
1	2,2541	32,201	32,20
2	1,29962	18,566	50,76
3	1,13178	16,168	66,93

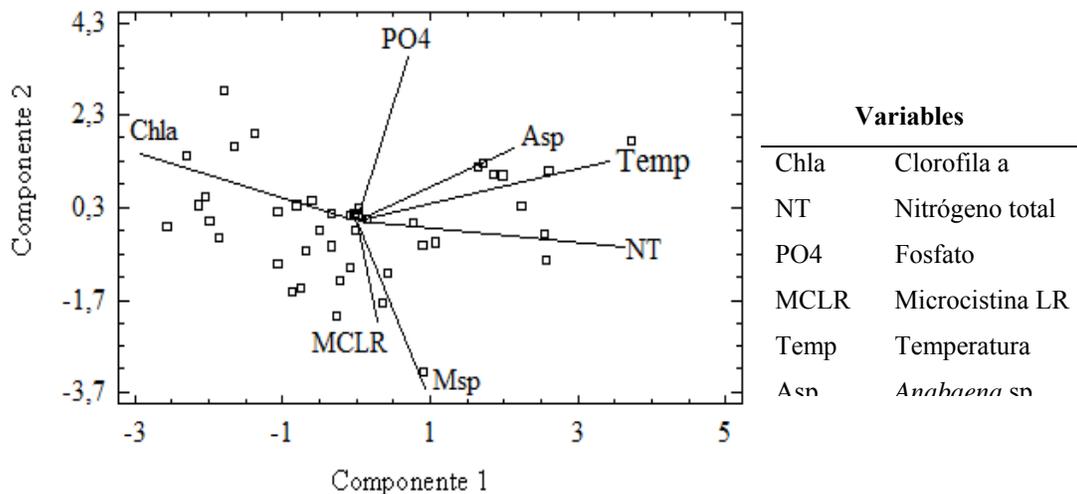


Figura 22. Proyección ortogonal de algunas variables físico-químicas y biológicas en el espacio definido por los dos primeros componentes del ACP en el embalse Clavellino desde enero a noviembre de 2007.

La variación temporal de la transparencia no presentó un patrón estacional definido y los valores son similares a los reportados por Ferraz-Reyes y Fernández (1988), quienes trabajaron el periodo de septiembre 1983- julio 1984. Sin embargo, difieren de los informados por Ortaz *et al.* (1999) para los embalses La Mariposa, La Pereza y Quebrada seca, también de los presentados por González *et al.* (2004b) para el Pao Cachinche. Estos valores pueden estar influenciados por las continuas descargas de los ríos tributarios. Este fenómeno se puede evidenciar en la estación 04, la cual presentó los menores valores de transparencia y es la más próxima a la desembocadura del río Santa María, uno de los principales afluentes del embalse. El ACP no muestra una relación directa entre la transparencia del agua y la concentración de chl *a*, lo que indica que la misma está influenciada por sólidos en suspensión traídos por los afluentes al embalse.

Las temperaturas mostraron, de manera general, una tendencia de incremento, registrándose las temperaturas más bajas entre enero y marzo, para el periodo de abril hasta julio las temperaturas se incrementaron un poco y, finalmente, los meses siguientes del estudio el agua mostró las temperaturas más altas. Este comportamiento, según Ferraz-Reyes y Fernández (1988), es consecuencia de la estratificación de la columna de agua, la cual ocurre durante los meses de abril a noviembre. Luego, por efectos de los vientos, ocurre el mezclado de la columna de agua, el cual va a durar desde diciembre hasta marzo, disminuyendo así la temperatura de las aguas superficiales. Estos valores fueron similares a los informados por Cova (2003) y Gómez (2006).

Los valores de pH fueron similares a los reportados por Cova (2003) y Gómez (2006) para el embalse Clavellino, esta característica se debe, principalmente, al carbonato de calcio disuelto proveniente de las formaciones de lutitas y calizas presentes en la cuenca del embalse, y se confirma con la presencia de la macroalga *Chara*. sp. Este género abunda en aguas con alto contenido en calcio. Cabe destacar

que los valores de temperaturas y pH registrados son propicios para el crecimiento de cianobacterias y con ello la producción de sus toxinas, según Roset y Aguayo (2001).

Los valores de oxígeno disuelto obtenidos son relativamente superiores a los informados por Ferraz-Reyes y Fernández (1988), para el mismo embalse. Este incremento se debe a una mayor actividad fotosintética y los fuertes vientos. El ACP muestra una relación negativa con el amonio y el pH, lo cual es un indicio de los procesos de descomposición de materia orgánica en la superficie del agua. Los valores de transparencia, pH y oxígeno disuelto se encuentran dentro de los límites establecidos en la Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5305, Decreto N° 3219 para aguas de este tipo.

Las concentraciones de amonio resultaron ser relativamente bajas y estables, durante todo el estudio, esto es, quizás, por la intensa utilización de los organismos fitopláctónicos como fuente de nitrógeno. Esto se puede evidenciar a través de los altos niveles de oxígeno disuelto, favoreciendo los procesos bioquímicos de nitrificación. Sin embargo, el día 60, correspondiente a marzo, se observa un considerable aumento en la concentración, en la estación 1, la cual se encuentra en la orilla, por lo que se puede asumir que este comportamiento se debe a una fuente puntual de amonio, proveniente de la descomposición de la macroalga *Chara*. sp. Los valores obtenidos son muy bajos en comparación con los reportados por González *et al.* (2004b), para el embalse Pao Cachinche y ligeramente mayor que los reportados por González *et al.* (2004a), para el embalse Agua Fría.

Las concentraciones de nitrito resultaron ser bajas, a excepción de los 17, 38 y 60, los cuales corresponden de enero a marzo. Estas altas concentraciones se pueden atribuir al efecto de mezclado en la columna de agua, observado por Ferraz-Reyes y Fernández (1988), incorporando así los nutrientes que se encuentran en las capas más profundas. También, se debe tomar en cuenta el efecto del reciclaje del amonio

(oxidación del amonio), ya que se detectaron altas concentraciones del mismo en las mismas fechas. El aumento observado durante los días 116 y 129, correspondientes a abril y mayo, pueden ser provenientes de las aguas de escorrentías producidas por las primeras lluvias, las cuales traen consigo gran cantidad de nutrientes depositados en las superficies de los suelos. Los valores obtenidos resultaron ser mayores que los reportados por González *et al.* (2004a) y González *et al.* (2004b) para los embalses Agua Fría y Pao Cachinche, respectivamente.

La concentración de nitrato resultó ser relativamente constantes, solamente dos muestreos resultaron con valores elevados, los cuales son los días 17 y 74, correspondientes a enero y marzo, respectivamente. Ambos fueron detectados en la estación 3, lo que indica que esta zona está influenciada por algún agente externo. De igual manera, las concentraciones resultaron ser más altas que las reportadas por González *et al.* (2004a), González *et al.* (2004b) para los embalses Agua Fría y Pao Cachinche, respectivamente.

El nitrógeno total detectado mostró su mayor concentración en la estación 1, en la cual las muestras fueron tomadas en la orilla. Por lo tanto, pueden estar influenciadas por las actividades antropogénicas. Los valores muy cercanos al máximo fueron detectados en la estación 4, la cual recibe descargas directas del río Santa María, con un alto contenido en materia orgánica. En cuanto al comportamiento, en general, se pueden asociar los primeros aumentos con el periodo de mezcla que experimenta el embalse hasta los meses de marzo y abril, según Ferraz-Reyes y Fernández (1988) y, para los meses siguientes del estudio, la contribución de los ríos y su alto contenido de materia orgánica. Estos valores son menores que los detectados por González *et al.* (2004a), para el embalse Agua Fría y Ortaz *et al.* (1999) para los embalses La Mariposa, La Pereza, Quebrada Seca y Lagartijo.

Las concentraciones de fosfatos fueron relativamente bajas y constantes, a excepción de los dos primeros muestreos, de los días 17 y 38, cuando se encontraron los valores más altos. Esto es debido, quizás, al continuo mezclado en la columna de agua, la cual trae consigo a las capas superiores cantidades de fosfatos atrapadas en el fondo, las cuales son liberadas en condiciones de anoxia (Wetzel, 2001). Sin embargo, cabe destacar que la geología del embalse apunta hacia una respuesta sobre las bajas concentraciones de fosfato. El embalse está formado por lutitas y calizas que son carbonato de calcio por lo que esta agua son ricas en calcio, esto se puede evidenciar a través de la presencia de la macroalga *Chara. sp*, los iones fosfato son atrapados rápidamente por los iones calcio y se produce su precipitación (Margalef, 1983). De esta manera, es controlada la cantidad fosfato libre o disponible en las aguas. A pesar de lo anterior, estos valores resultaron ser mayores que los reportados por González *et al.* (2004a) y menores que González *et al.* (2004b)

Las concentraciones de fósforo total no muestran un patrón definido. Los niveles se van incrementando desde el inicio del estudio hasta abril, cuando los valores bajan rápidamente y se mantienen estables, durante el resto del estudio. Estos valores resultaron menores a los reportados por Ortaz *et al.* (1999) y mayores que los encontrados por González *et al.* (2004a) para el embalse Agua Fría, embalse ultraoligotrófico, según el criterio de Salas y Martínó (1991).

La clorofila *a* presentó una fuerte variación temporal, este comportamiento resultó ser similar al reportados por Ferraz-Reyes y Fernández (1988), quienes encontraron la menor concentración de clorofila *a* en la misma época, atribuyendo este comportamiento a la estabilidad de la columna de agua y al cambio en la composición florística en el agua. El resto del tiempo de estudio mostró valores relativamente estables, a excepción del día 194, correspondiente al mes de julio, el cual generó un aumento significativo. Este aumento, posiblemente, se debe a la estabilidad de las aguas superficiales y a la entrada de nutrientes a través de las agua

de escorrentía y aporte de los ríos tributarios. Los valores reportados son menores que los reportados por González *et al.* (2004b) para el embalse Pao Cachinche. Sin embargo, supera el máximo establecido por las normas venezolanas, según Gaceta Oficial N 5305 Decreto N 3219, que establece que para aguas de este tipo el máximo de clorofila *a* es de $12 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

El análisis de componentes principales (ACP) demuestra una relación inversa entre la concentración de Clorofila *a* y la de fosfatos, como se ha observado en muchos estudios. El fosfato soluble o disponible es esencial para el desarrollo del fitoplancton, el cual es la fuente de clorofila *a* (Roldan, 1992). El nitrógeno total también muestra una relación inversa con la concentración de clorofila *a*, pero en mayor proporción, lo que es un indicativo de la gran utilización de este elemento para el crecimiento del fitoplancton. En el embalse, aunque las concentraciones de nitrógeno son altas, el crecimiento de las microalgas está limitado por la concentración de fósforo, debido a que la relación $N_{\text{total}}/P_{\text{total}}$ es mayor a 9, según Sas (1989).

Las concentraciones de nutrientes no superan el límite establecido por en la Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5305, Decreto N° 3219, para aguas de este tipo. Sin embargo, la concentración de clorofila *a* sí, lo que sugiere que los nutrientes que entran al embalse son atrapados rápidamente por los organismos fitoplanctónicos. Los resultados indican que la variación de la biomasa en el embalse no dependen solamente de la entrada de nutrientes si no de otros factores. Además, la ausencia de diferencias significativas en la casi la totalidad de los parámetros estudiados indica la buena circulación de las agua superficiales.

Los resultados obtenidos con HPLC-UV concuerdan con la presencia y abundancia de cianobacterias determinadas en este estudio (Fig. 14). La mayor concentración de microcistinas L-R se obtuvo en el muestreo realizado el día 129,

correspondiente a mayo en la estación 1. Las especies de cianobacterias dominantes fueron *Anabaena* sp. y *Microcystis* sp. Estos organismos han sido señalados por Amé *et al.* (2003) como los principales productores de microcistinas en cuerpos de agua dulce.

Los resultados obtenidos de la flora fitoplanctónica, para la época de sequía y transición, coinciden con lo señalado por Ferraz-Reyes y Fernández (1988), quienes determinaron que las cianobacterias, en particular la *Microcystis aeruginosa*, tienden a predominar desde marzo a julio. Mez *et al.* (1997) han establecido que los miembros toxigénicos del género *Microcystis* florecen en los periodos de temperatura cálida (30 y 32 °C) y en áreas tropicales.

Las microcistinas fueron detectadas tanto en los periodos de lluvia como en transición y sequía, encontrándose solamente la microcistina R-R durante el periodo de sequía. Sin embargo, para los periodos de transición y lluvia se registró la presencia de la microcistina L-R, la cual es la más común y tóxica (Carmichael, 1994). Estos resultados difieren en los reportados por Gómez (2006) quien detectó una sola variante de microcistinas, únicamente en el periodo de transición. Esto pudo deberse a que durante nuestro estudio el embalse tardó unos meses más alcanzar su cota máxima, permitiendo así que las cianobacterias que se encontraron presentes durante el periodo de transición todavía pudieran permanecer, hasta colmatado la capacidad del mismo, y el agua comenzara a fluir, lo cual impediría el crecimiento y floración de las cianobacterias.

La toxicidad de los extractos en los nauplios de *A. salina* coincidió con los resultados de los análisis de HPLC-UV. Sin embargo, solamente cuatro de los extractos que presentaron mortalidad resultaron ser tóxicos, según el criterio de Meyer (1982). El extracto que mayor toxicidad presentó fue el obtenido en la estación 1 del día 129 correspondiente al 09/05/07, el cual resultó contener la concentración

mas elevada de microcistina L-R.

La concentración de microcistina R-R resulto ser bastante baja $0,140 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Sin embargo, las concentraciones de la microcistina L-R encontradas si fueron altas, de acuerdo con el valor ($1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) limite establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS; Chorus y Mur, 1999) como seguro para consumo humano. Si embargo estas concentraciones resultaron ser más bajas que las reportadas por Gómez (2006).

CONCLUSIONES

La temperatura, el pH y las condiciones climáticas, durante los periodos sequía y transición, son propicios para el crecimiento de las cianobacterias.

La presencia de microcistinas en las épocas de sequía, transición y lluvia no solamente está supeditada a la concentración de nutrientes, si no a otros factores ambientales como las estaciones.

A pesar que los valores de pH, transparencia, oxígeno disuelto, nitrito y nitrato cumplen con los límites establecidos por el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente (MPPA) para cuerpos de agua de este tipo, se detectó la presencia de dos variantes de las microcistinas R-R y L-R de las cuales, la última superó el límite establecido por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.).

La ausencia de diferencias espaciales significativas de casi todos los parámetros medidos es un indicativo del buen mezclado de las aguas superficiales en el embalse.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, es necesario sugerir lo siguiente:

Implementar un programa de monitoreo, a través de la creación de un equipo multidisciplinario que incluya la detección y cuantificación de cianobacterias, además de un estudio profundo de los factores locales activadores del crecimiento de estos organismos. La eliminación de la actividad ganadera en las orillas del embalse, evitar el uso de alguicidas ante la presencia de floraciones algales y concientizar a las poblaciones aledañas a los principales ríos tributarios del embalse a fin de evitar la contaminación de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

Amé, M.; Diaz, M. y Wunderlin, D. 2003. Aislamiento e identificación de toxinas de cianobacterias. *Environ. Toxicol.* 18(3): 192-201.

Azevedo, S.; Carmichael, W.; Jochimsen, E.; Rinehart, K.; Lau, S.; Shaw, G. y Eaglesham, G. 2002 .Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru*/Brazil. *Toxicology*, 23: 441-446.

Bendscheider, K. y Robinson, R. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Mar.Res.*, 11: 87-96.

Boyer, J.; Sterling, P. y Jones, R. 2000. Maximizing information from a water quality monitoring network through visualization techniques. *Est. Coast and Shelf Sci.*, 50: 30-48.

Carmichael, W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.*, 270: 78-86

Contreras, F.; Castañeda, O., García-Nagaya, A. y Gutiérrez, F. 1995. Nutrientes en 31 Lagunas costeras Mexicanas 1.Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Dpto. de Hidrobiología. México. D.F.

Cova M. 2003. Variación espacio temporal de algunos grupos de microalgas en las riberas el embalse Clavellino (Estado Sucre), durante el periodo julio 1999 - junio 2000. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumana, Venezuela.

Chorus I. y J. Bartram. 1999. *Toxic cyanobacteria in water*. WHO. E&FN Spon. London, UK.

De León, L. y Yunes, J. 2001. First report of a Microcysting-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Env. Toxicol.*, 16(1):110-112.

Escaplés, M. 1999. Estándares para bioensayo de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. *INTEVEP*, 2: 213-214.

Ferraz-Reyes, E y Fernández, E. 1988. Ciclo de fitoplacton y bacterioplacton en el embalse Clavellino. Estado Sucre. Venezuela. *Bol. Inst .Oceanogr. Univ. Oriente*, 27(1-2) 315:327.

Fischer, W. y Dietrich, D. 2000. Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcistin-LR and -RR in early life stages of the African clawed frog. (*Xenopus laevis*). *Aquat. Toxicol.*, 49: 189-198.

Gómez, D. 2006. Desarrollo cromatografico para separar microcistinas presentes en las cianobacterias de los embalses Clavellino y el cordón de Cariaco, (Estado Sucre). Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumana, Venezuela.

González, E; Carrillo, V. y Peñaherrera C. 2004. Características físicas y químicas del embalse Agua Fría (Parque Nacional Macarao, Estado Miranda, Venezuela). *Act. Cient. Venez.*, 55: 225-236.

González, E.; Ortaz, M.; Peñaherrera, C. y Matos, M. 2004 .Fitoplancton de un embalse tropical hipereutrífico (Pao-Cachinche, Venezuela): abundancia, biomasa y

producción primaria. *Interciencia*, 29: 10.

Hilborn, E.; Carmichael, W.; Yuan, M. y Azevedo, S. 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. *Toxicon*, 46: 218-221.

Horne, A. y Goldman, C. 1994. *Limnology*. 2nd edition. McGraw-Hill. New York, EEUU.

Hubert, Ph.; Chiap, P.; Crommen, J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Mercier, N.; Bervoas-Martin, S.; Chevalier, o.; Grandjean, D.; Lagorce, P; Lallier, M.; Laparra, M.; Laurentie, M. Y Nivet, J. 1999. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bionalysis: from the Washintong Conference to the laboratory. *Anal. Chim. Act.*, 391: 135-148.

Infante, A. 1988. *El plancton de las aguas continentales*. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Serie de Biología. Monografía 33. Washington D. C, EEUU.

Johnson, R. y Wichern, D. 1992. *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice-Hall Int. 3th ed. Canadá.

Koroleff, F. 1969. Direct determination of ammonia in natural water as indophenol blue. *Int. Counc. Explor. Sea. C.*,(9): 19-22.

Kuiper-Goodman, T.; Falconer, I. y Fitzgerald, J. 1999. Cyanobacterial toxins. En: *Toxic cyanobacteria in water*. Chorus, I. y Bartram, J. (eds). E and FN Spon, London, U.K.

- Lacroix, G. 1992. *Lagos y ríos. Medios vivos*. Plural. Barcelona, España.
- Lee, T. y Chou, H. 1997. Isolation and identification of microcystins from blooming *Microcystis* in an ell pond and a cultured M.TN-2 strain of *Microcystis*. *Phycology*, 36 (4): 59.
- Loreto, C.; Rosales, N.; Bermúdez, J. y Morales, E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación con la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gay. Bot.*, 60(2) 83-89.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Ediciones Omega S.A., Barcelona, España.
- Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nichols, E. y Mclaughlin, J. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plant Res.*, 45: 31-34.
- Mez, K.; Beattie, K.; Codd, G.; Hanselmann, K.; Hauser, B.; Naegeli, H. y Preisig, H. 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal Phycology*, 32: 111-117
- Murphy, J. y Riley, J. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 12: 162-170.
- McElhiney, J. y Lawton, L. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol. Appl Pharmacol.*, 203: 219-230.
- Ortiz, M; González, E; Manduca, J; Peñaherrera, C. y Montes, E. 1999. Características limnológicas de los embalses La Pereza, Lagartijo, La Mariposa y Quebrada Seca y preservación del zooplancton como controlador de microalgas,

mediante técnicas de biomanipulación. Informe técnico presentado a las compañías Hidroimpacto C.A. e Hidrocapital.

Palacios, M y Pereira, G. 2000. Ensayos toxicológicos acuáticos. *Act. Cient. Venez.*, 48: 58-61.

Robillo, C.; Winh, J.; Puiseus-Dao, F. y Hennion, M.2000. Hepatotoxin production kinetic of the cyanobactryum *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC–Mass Spectrometry and protein phosphatase biossay. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 3372-3378.

Roldán, G. 1992. *Fundamentos de Limnología neotropical*. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Rosales, N.; Ortega, J.; Mora, R. y Morales, E. 2005. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Cienc. Mar.*, 31(2): 349-355.

Roset, J. y Aguayo, S. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. *Rev. Toxicol.*, 18:65-71

Salas, H. y Martinó, P. 1991. A simplified phosphorus trophic model state for warm-water tropical lakes. *Wat. Res.*, 25: 341-350.

Sas, H. 1989. *Lake restoration by reduction of nutrient loading: Expectations, experiences, extrapolations*. Academic Verlag Richarz, St. Augustin.

Senior, W. 1987. *Guía de análisis químico del agua de mar*. Dpto. Oceanogr. I.O.V. Univ. Oriente. Cumaná, Venezuela.

Sivonen, K. y Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. En: *Toxic cyanobacteria in water*. Chorus, I. y Bartram, J. (eds). E and FN Spon, London, U.K.

Stephan, C. 1977. Methods for calculating an CL_{50} . Aquatic toxicology and hazard evaluations ASTM-STP634. Meyer y Hamelink. (eds). American Society for testing material. Pags. 65-84.

Strickland, J. y Parsons, T. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 167: 203.

Tréguer, P. y Le Corre P. 1975. *Manual d'analyses des sels nutritifs dans l'eau de mer*. Utilization l'autoanalyser II. Techicon. LOC-UBC. 2ed. 110.

Utermohl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton methoding. Mitt Verein. Theor. Angew. *Limnol*, 9: 1-38.

Valderrama, J. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.*, 10: 109-122.

Wetzel, R. G. (2001). *Limnology*. Lake and river ecosystems. 3rd edition. Academic Press. San Diego, Ca., EEUU. 1006 pp.

Wood, E., Armstrong, F. y Richards, F. 1967. Determination of nitrite in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 47: 23.

Zingone, A y Sarno, D .2001. Recurrent patterns in coastal phytoplankton the gulf of Naples. *Archo Oceanogra. Limnol.* 22: 113-118

APENDICE

Apéndice A

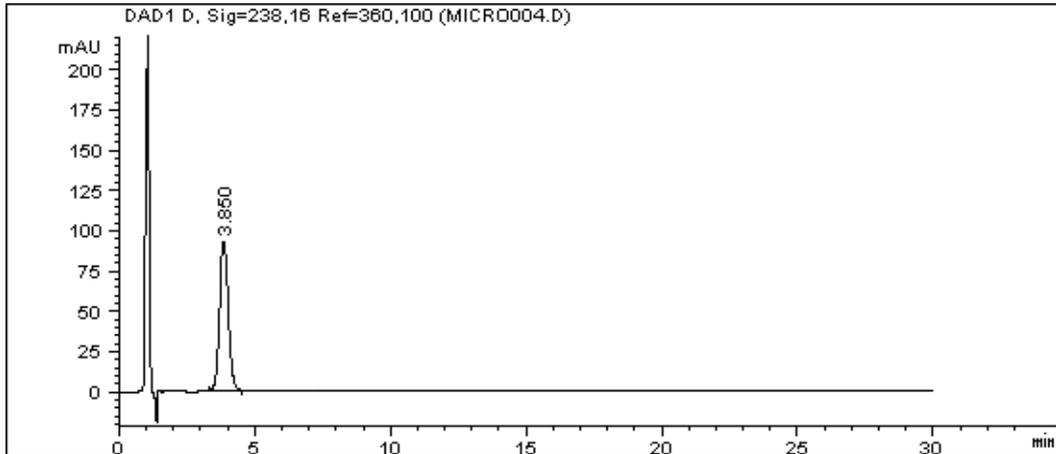


Figura A1. Patrón de microcistina L-R a una concentración de 125 µg·ml.

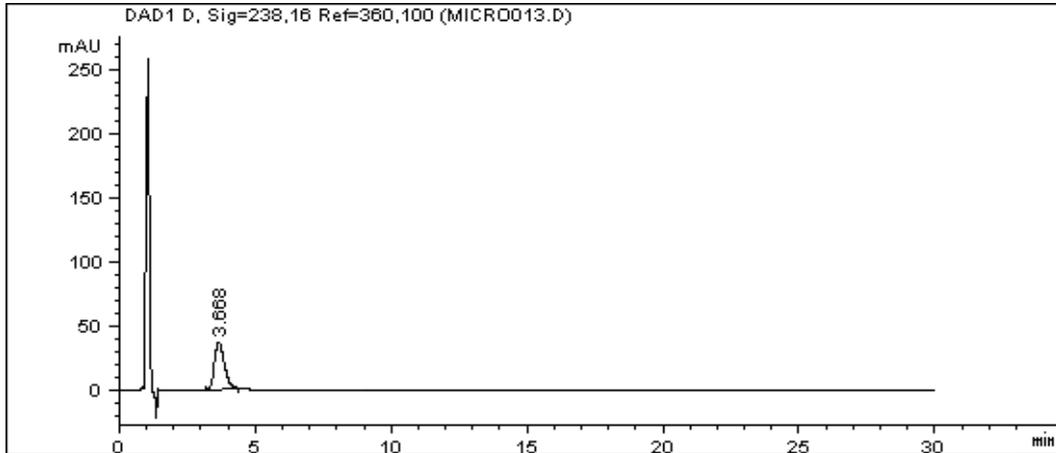


Figura A2. Patrón de microcistina L-R a una concentración de 62,5 µg·ml.

Apéndice B

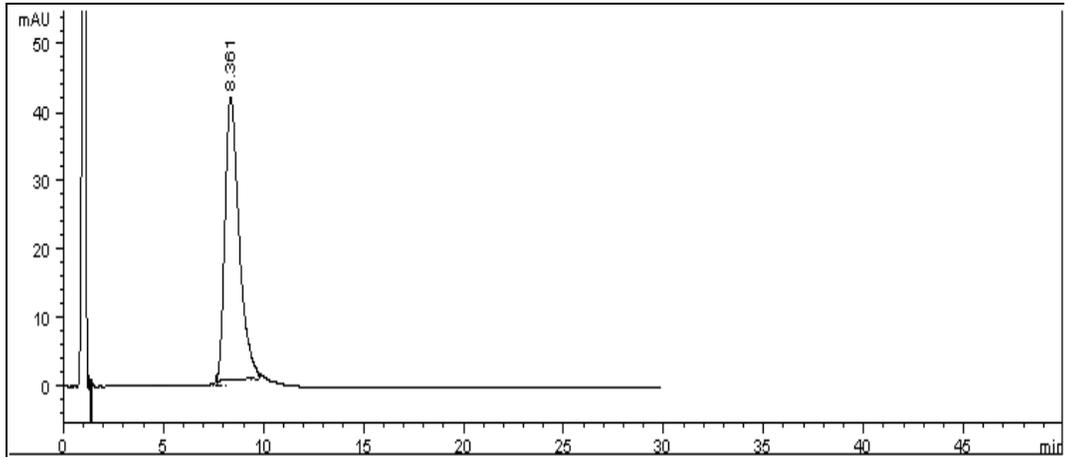


Figura B1. Patrón de microcistina R-R a una concentración de 125 µg·ml.

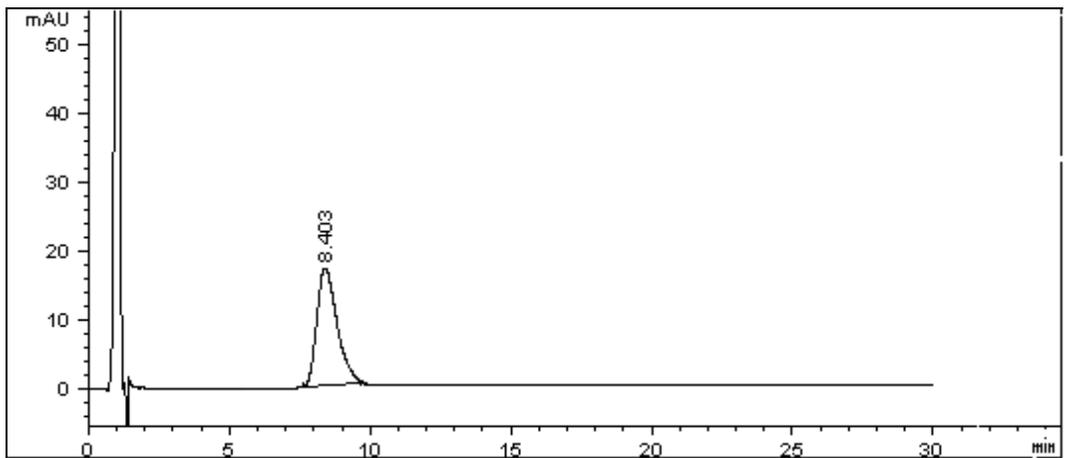


Figura B2. Patrón de microcistina R-R a una concentración de 25 µg·ml.

Apéndice C

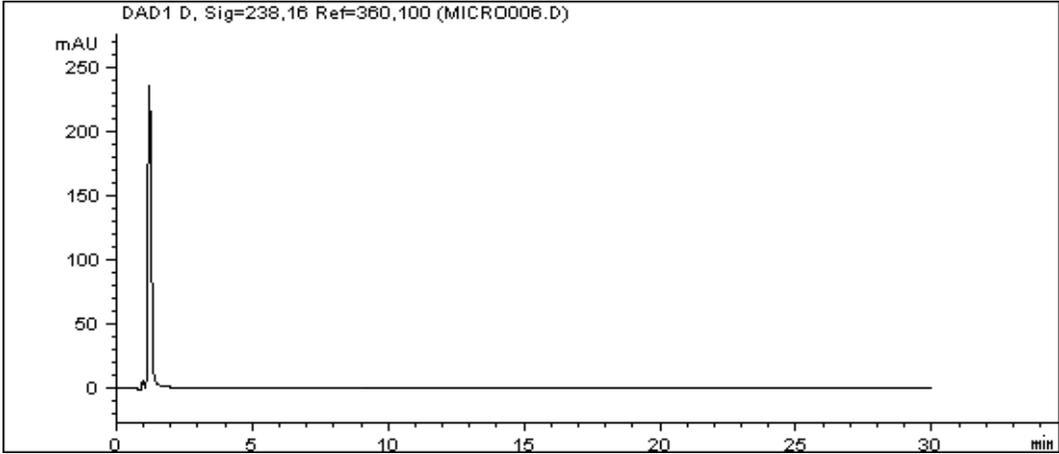


Figura C1. Blanco de ácido acético al 5%

Apéndice D

Tabla D.1 Áreas obtenidas para los patrones de microcistina L-R y R-R a distintas concentraciones.

Patrón	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Área
	250,0	4186,3
	125,0	2066,1
Microcistina L-R	62,5	957,9
	250,0	7297,7
Microcistina R-R	125,0	3300
	50	1300

Tabla D.2 Áreas obtenidas en las muestras de agua en las distintas estaciones muestreadas del embalse clavellino.

Fecha	Estación	Área
07/02/2007	04	10,6
09/05/2007	01	147,4
	04	30,2
21/06/2007	01	12,6
	03	11,3
12/07/2007	02	61,8
	03	29,5
30/08/2007	03	37,6

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –
5/5

Derechos:

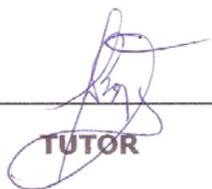
Yo, Edgar A. García M., portador de la C.I N° 15.317.801, autorizo.
a la Biblioteca Central de la UDO-Sucre la utilización de mi trabajo
de grado, para ser publicada en su totalidad.



AUTOR 1

AUTOR 2

AUTOR 3



TUTOR

AUTOR 4

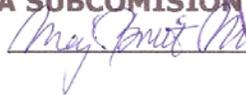


JURADO 1



JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:



Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	VARIACIÓN TEMPORAL DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROCISTINAS Y SU RELACION CON ALGUNOS PARÁMETROS AMBIENTALES EN AGUAS DEL EMBALSE CLAVELLINO, ESTADO SUCRE (Modalidad: Investigación)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	García Marcano, Edgar Alexander	CVLAC
e-mail		Tukani2000@yahoo.es
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Cianobacteria
microcistina
Toxinas

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	QUIMICA
	Análisis Instrumental
	Ambiental

Resumen (abstract):

Se estudió la variación de la concentración de microcistinas y su relación con algunos parámetros ambientales en el embalse Clavellino, estado Sucre, Venezuela, desde enero hasta noviembre de 2007. Para tales fines se fijaron cuatro estaciones georeferenciadas, de las cuales tres se encontraban en el canal central del embalse y una en la orilla. Se obtuvieron los siguiente valores promedios: 2,2 m de transparencia, 29 °C de temperatura, 8,06 unidades de pH, 10 ml·l⁻¹ de O₂, 0,32 μmol·l⁻¹ de NH₄⁺, 0,25 μmol·l⁻¹ de NO₂⁻, 0,70 μmol·l⁻¹ de NO₃⁻, 28,94 μmol·l⁻¹ de nitrógeno total, 0,23 μmol·l⁻¹ de PO₄³⁻, 0,53 μmol·l⁻¹ de fósforo total y 15,04 μg·l⁻¹ de clorofila *a*. Además, se identificaron dos variantes de microcistinas, la L-R y la R-R. La primera, con un valor promedio de 0,75 μg·l⁻¹, siendo detectada en 8 muestreos, el máximo valor (1,81 μg·l⁻¹) de microcistina L-R fue superior al establecido por la Organizaron Mundial de la Salud (O.M.S.), como seguro para aguas de consumo humano y animal. Se determinó la existencia de una relación inversa entre la concentración de microcistina y el pH. Además, se encontró que en el embalse el aumento de la clorofila *a* depende de las concentración de nitrógeno total.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Dra. Luisa Rojas De Astudillo	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
MSc. Rafael Diaz Ramos	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	02	19

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis Digital Edgar.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: intemporal _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Química

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –
5/5

Derechos:

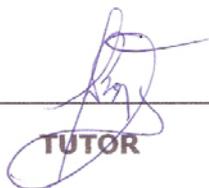
**Yo, Edgar A. García M., portador de la C.I N° 15.317.801, autorizo.
a la Biblioteca Central de la UDO-Sucre la utilización de mi trabajo
de grado, para ser publicada en su totalidad.**



AUTOR 1

AUTOR 2

AUTOR 3



TUTOR

AUTOR 4



JURADO 1



JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

