

Efecto fitotóxico del material particulado PM10 recolectado en el área urbana de la ciudad de Cuenca, Ecuador

Phyto-toxic effect of particular material PM10 collected in the urban area of the city of Cuenca, Ecuador

Diana Lucía Moscoso-Vanegas
Universidad de Cuenca,
Cuenca, Ecuador
diana.moscoso@ucuenca.edu.ec

Lorena Marisol Monroy-Morocho
Universidad de Cuenca,
Cuenca, Ecuador
loresol92@hotmail.com

Mónica Alexandra Narváez-Vera
Universidad de Cuenca
Cuenca, Ecuador
monica.narvaez@ucuenca.edu.ec

Claudia Espinoza-Molina
Empresa de Movilidad, Tránsito y Transporte de la EMOV EP
Cuenca, Ecuador
cespinoza@emov.gob.ec.

Ana Lucía Astudillo-Alemán
Universidad de Cuenca
Cuenca, Ecuador
ana.astudillo@ucuenca.edu.ec

Resumen- Los contaminantes atmosféricos causan efectos adversos sobre los vegetales, no obstante, a ciencia cierta, se desconoce el efecto del PM10 sobre estos, la presente investigación tiene por objeto determinar el efecto fitotóxico de extractos acuosos de material particulado PM10, provenientes de tres sitios de la zona urbana del cantón Cuenca, Ecuador, mediante el método descrito en la normativa nacional (texto unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente), sobre el crecimiento de la raíz y el hipocótilo de semillas de *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea itálica*, *Raphanus sativus*. Para la caracterización del material particulado en metales pesados (cadmio, manganeso, níquel y plomo) se empleó el método de espectroscopia de absorción atómica EPA 3005a, posteriormente se obtuvieron los extractos acuosos con agua ultra pura por ultrasonificación durante 30 minutos, las semillas fueron expuestas a cuatro diluciones de la fracción acuosa de PM10 (100%, 10%, 1% y 0,1%) por un tiempo de exposición de corta duración, los datos fueron analizados en los programas IBM SPSS Statistics 22 y GraphPad Prism y mediante el estadígrafo de Kruskal Wallis. Los resultados muestran que el efecto fitotóxico del PM10 podría atribuirse a las especies reportadas en el extracto acuoso (Mn, Ni, Pb y Cd) además se evidenció que la inhibición al crecimiento del hipocotilo fue superior al de la raíz.

Palabras clave- Fitotoxicidad, PM10, Bioensayos, Vegetales, metales pesados.

Abstract- The atmospheric pollutants cause adverse effects on plants, although the effect of PM10 on them is not known for sure, the present investigation aims to determine the phytotoxic effect of aqueous extracts of PM10 particulate material, coming from three sites of the urban area of the Cuenca- Ecuador canton, using the method described in the National regulations (Unified Text of Secondary Environmental Legislation of the Ministry of the Environment), on the growth of the root and hypocotyl of seeds of *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea italica*, *Raphanus sativus*. For the characterization of the particulate material in heavy metals (cadmium, manganese, nickel and lead), the EPA 3005a atomic absorption spectroscopy method was used, then the aqueous extracts were obtained with ultra pure water by ultrasonication for 30 minutes, the seeds were exposed to four dilutions of the aqueous fraction of PM10 (100%, 10%, 1% and 0.1%) during a short exposure time, the data were analyzed in the IBM SPSS Statistics 22 and GraphPad Prism programs and through the Kruskal Wallis's statistician. The results show that the phytotoxic effect of PM10 could be attributed to the species reported in the aqueous extract (Mn, Ni, Pb and Cd). It was also shown that the hypocotyl growth inhibition was superior to that of the root.

Keywords- Phytotoxicity, PM10, Bioassays, vegetables, Heavy Metals.



1. INTRODUCCIÓN

El aire es una mezcla gaseosa que los seres vivos necesitan para su supervivencia, y que en presencia de agentes extraños denominados contaminantes atmosféricos presenta una reducción en su calidad. La contaminación del aire es una amenaza aguda, acumulativa y crónica para la salud humana y el ambiente [1]. Numerosas investigaciones asocian las partículas de aire contaminado con el desarrollo de enfermedades y muerte por daño respiratorio, cardiovascular, e irritación de ojos y nariz [2] [3] [4]. Generalmente estos efectos se atribuyen a que el material particulado tiene como parte de su composición química metales como el aluminio, cadmio, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, zinc y plomo, al ser en su mayoría de origen antropogénico [5] como trastornos respiratorios, cardiovasculares y cáncer. La toxicidad y el efecto inflamatorio de estas partículas están relacionados con su tamaño y características químicas. El objetivo de este estudio fue determinar las características químicas de la fracción hidrosoluble de Material Particulado PM10, recolectado en tres sitios de monitoreo de la ciudad de Cuenca-Ecuador, y evaluar su actividad genotóxica e inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

El material particulado está constituido por material sólido o líquido en forma de partículas, con excepción del agua no combinada, presente en la atmósfera. Se designa como PM2,5 al material particulado cuyo diámetro aerodinámico es menor a 2,5 micrones. Se designa como PM10 al material particulado de diámetro aerodinámico menor a 10 micrones [6].

El material particulado afecta a la vegetación circundante, generando alteraciones en la fotosíntesis, cambios en la composición química del suelo y modificaciones en el crecimiento y reproducción de las plantas [7]. La vegetación expuesta a contaminantes atmosféricos presenta lesiones como la caída de flores y en la mayoría de casos pierden su color, se ven invadidas por partículas que descansan sobre sus hojas, ocasionando que estos vegetales estén expuestos a cambios físicos o químicos que se pueden manifestar en los distintos órganos de la planta, como por ejemplo en la reducción del crecimiento de la radícula y la planta en general, el enrollamiento

foliar, manchas, clorosis, necrosis; existiendo una mayor afección en plantas que se encuentren en áreas con más contaminantes [8]. Entre los ensayos con plantas vasculares recomendados para la evolución de efectos fitotóxicos, se encuentran aquellos que recurren al uso de semillas de plantas terrestres, evaluando principalmente el efecto de los contaminantes en el proceso de germinación, desarrollo y establecimiento de las plántulas en los primeros días de crecimiento [9].

Investigaciones realizadas en el Centro de Estudios Ambientales (CEA) de la Universidad de Cuenca, Ecuador determinaron que el material sedimentable recolectado en el área urbana de la ciudad de Cuenca afectó al desarrollo del vegetal [10]. Por tanto, los contaminantes atmosféricos causan efectos adversos sobre los vegetales, no obstante, a ciencia cierta, se desconoce el efecto del PM10 sobre estos. De allí la importancia que adquieren los bioensayos llevados a cabo con especies terrestres, consideradas sensibles (*Brassica oleracea*, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus*, *Nasturtium officinale*, *Zea mays*), que en un menor tiempo de exposición y sin requerir equipamiento sofisticado ni altos costos, resultan sumamente útiles para ser aplicados en muestras ambientales o en el monitoreo de procesos tóxicos [11] [12]. Este bioensayo se basa en el crecimiento de la raíz e hipocótilo como puntos finales de lectura, al ser estas partes más sensibles a la toxicidad [10]. Cabe mencionar que la elongación de la radícula e hipocótilo son indicadores muy sensibles en la evaluación de efectos fitotóxicos [13].

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto fitotóxico de extractos acuosos de PM10, recolectados en tres puntos estratégicos de la ciudad de Cuenca, relacionando el efecto con la concentración de metales pesados presentes en el mismo, mediante un bioensayo en las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), rábano (*Raphanus sativus*) y brócoli (*Brassica oleracea itálica*).

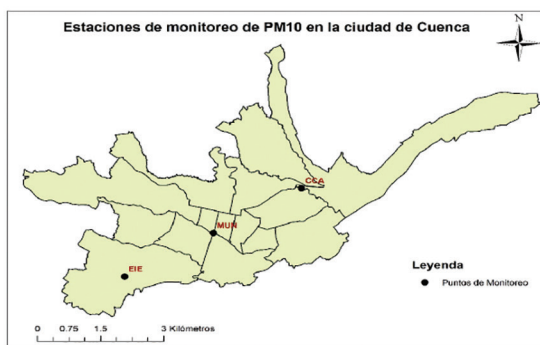
2. METODOLOGÍA

2.1 Zona de estudio

Las muestras de PM10, empleadas para desarrollar el trabajo, fueron facilitadas por la empresa de movilidad, Tránsito y Transporte (EMOV EP) de la ciudad de Cuenca, las mismas que se mo-

nitorearon con equipos semiautomáticos de alto volumen durante 24 horas consecutivas de exposición, durante el año 2014. Las estaciones se encuentran distribuidas a lo largo de la ciudad (Fig. 1), cuyas coordenadas se detallan en la Tabla 1.

Fig. 1. MAPA DE UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO



Fuente: Los autores

2.2 Número de muestras

Por cada punto de monitoreo se analizaron dos filtros, uno de máxima y otro de mínima concentración, con la finalidad de evaluar si el efecto fitotóxico depende de las concentraciones de material particulado y presencia de las especies químicas determinadas en este.

2.3 Ensayos de fitotoxicidad

Para los ensayos de fitotoxicidad se empleó un método de prueba estática de toxicidad aguda en 120 horas de exposición, el mismo que evalúa los efectos fitotóxicos del PM10 en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros cinco días de crecimiento (radícula e hipocótilo) [13].

2.4 Ensayo de viabilidad

Para los ensayos de viabilidad se consideraron seis especies distintas de semillas: lechuga (*Lactuca sativa*), rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*), remolacha (*Beta vulgaris*), nabo (*Brassica rapa*) y brócoli (*Brassica oleracea itálica*).

Para el bioensayo se utilizaron aquellas especies cuyo porcentaje de germinación fue mayor al 90%, lechuga (*Lactuca sativa*), rábano (*Raphanus sativus*) y brócoli (*Brassica oleracea itálica*).

Las semillas empleadas presentaron las siguientes características: pureza: 99,90%; germinación: 85%; material inerte: 10%; fecha de expiración: 6/2018 [14].

2.5 Obtención del extracto acuoso de PM10

El material particulado contenido en los filtros se extrajo con agua ultra pura, por ultrasonificación durante 30 minutos a temperatura ambiente, empleando un ultrasonido marca Cole-Parmer 8894. Por cada filtro se obtuvieron 120 mL de solución o extracto acuoso. Posteriormente el extracto acuoso fue centrifugado a 2500 g durante 30 minutos para sedimentar la materia insoluble. Las soluciones frescas preparadas fueron almacenadas a 4 °C para su posterior empleo en el ensayo de fitotoxicidad y análisis de metales pesados.

2.6 Caracterización de PM10

El método analítico empleado para determinar la presencia de metales en los filtros fue el Método de la Agencia de Protección Ambiental por sus siglas en inglés EPA 3005^a, "Acid digestion of waters for total recoverable or dissolved metals for analysis by flaa or icp spectroscopy", el cual contempla la digestión ácida en la que toda muestra se acidifica en el momento de recogida con ácido nítrico. En el análisis, la muestra se calienta con ácido y es reducido sustancialmente en volumen. El digestato se filtra y nuevamente su volumen es disminuido, estando lista para obtener su resultado. Para ello se empleó el equipo de absorción atómica EAA Perkin Elmer AA400.

2.7 Preparación de diluciones

Con el fin de determinar la fitotoxicidad a distintas concentraciones de PM10, se prepararon diluciones seriadas con un factor de 10 y con un medio de dilución agua desionizada, obteniendo concentraciones menores a partir de una concentración madre.

Por cada muestra de papel filtro se prepararon 4 diluciones (100 %, 10 %, 1 %, 0.1 %), y un control negativo (agua destilada).

2.8 Bioensayo

El bioensayo se basó en el método adaptado por Sobrero y Ronco [15] en el laboratorio del Centro de Estudios Ambientales. Las pruebas se realizaron con una exposición de los extractos a 120 horas. El análisis de las muestras se hizo por triplicado para cada concentración (control negativo; 100%; 10%; 1%; 0,1%).

2.9 Condiciones del bioensayo

En la Tabla II se resume las condiciones ambientales en las cuales se hizo el bioensayo.

2.10 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el programa IBP-SPSSTM versión 23.0 aplicando las pruebas ANOVA, Kruskal-Wallis, test de comparación múltiple de Dunn, U de Mann-Whitney.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Pruebas de viabilidad

Los resultados de las pruebas de viabilidad hechas a las seis especies de semillas se muestran en la Tabla III.

Tabla I
COORDENADAS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO DE PM10

Código	Nombre	Ubicación	Latitud	Longitud
EIE	Escuela Ignacio Escandón	Avenida Loja y Calle Ignacio de Rocha	-2.916303°	-79.034047°
MUN	Municipio	Calle Simón Bolívar y Calle Presidente Borrero	-2.897001°	-79.003000°
CCA	Colegio Carlos Arízaga	Calle J. Lavalle y Calle A. Ricaurte	-2.880532°	-78.980024°

Fuente: Los autores

Tabla II
RESUMEN DE LAS CONDICIONES DEL BIOENSAYO

Tipo de ensayo	Estático
Duración de la prueba	120 horas
Temperatura	22,5 °C
Humedad	47,7 %
Volumen de la solución de prueba	5,0 ml
Número de vegetales	3,0
Número de réplicas por concentración	3,0
Número de organismos por dilución	20,0
Número de tratamientos	5 (control negativo; 100 %; 10 %; 1 %; 0,1 %)

Fuente: Los autores

Tabla III
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE VIABILIDAD PARA CADA ESPECIE

% De germinación		
Semilla	Prueba 1	Prueba 2
Lactuca sativa	100%	85%
Raphanus sativus	100%	100%
Allium cepa	60%	75%
Beta vulgaris	90%	85%
Brassica rapa	90%	85%
Brassica oleracea itálica	100%	95%

Fuente: Los autores

Las semillas de *Raphanus sativus*, *Brassica oleracea itálica* y *Lactuca sativa* presentan una germinación mayor al 90%, estas semillas se utilizaron para el bioensayo concordando con las recomendadas por la Agencia de Protección al Medioambiente y por la Administración de Drogas y Alimentos, por su sensibilidad en comparación con otras plantas [14] [15].

Los resultados corroboran ciertos estudios donde utilizan estos vegetales para realizar bioensayos. En el estudio de evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas se obtuvo un valor mayor al 90% de germinación en el *Brassica oleracea itálica*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* y *Zea mays* [15]. En otro estudio denominado Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* (L.) en la determinación de calidad de agua en represas para riego se reportó un porcentaje de germinación mayor al 90% [16].

3.2 Caracterización de metales pesados

La Tabla IV expone los resultados de la caracterización de metales pesados en las seis muestras de PM10 para los diferentes puntos de monitoreo.

Las muestras analizadas reportan para el Cd, Mn y Ni la mayor concentración en la estación 3-405** con un valor de 4,694 ng/m³, 55,532 ng/m³ y 62,401 ng/m³, respectivamente, los valores pertenecientes al Cd y Mn se encuentran por debajo del límite máximo permisible que establece un valor de 5 ng/m³ para el Cd y 150 ng/m³ para el Mn valores determinados por la OMS, mientras que el níquel sobrepasa el límite máximo establecido 20 ng/m³ por los estándares de calidad del aire de la legislación de Estados Unidos [14] [17].

En el reporte de la concentración del Pb se evidencia que el máximo valor detectable es de 9,35 ng/m³ en la muestra 1-460* y el menor valor es de 3,875 ng/m³ en la estación 2-460* valores que se encuentran por debajo del límite permisible establecido por la OMS (500 ng/m³). Este resultado podría asociarse al elevado tráfico vehicular, ya que este compuesto tiene su origen en el sistema de escape de los vehículos, por el empleo de combustibles [18].

3.3 Porcentaje de germinación

La Tabla V presenta la media de los porcentajes de germinación de los tres tipos de semillas empleados en los bioensayos a los diferentes tratamientos aplicados. Las pruebas se hicieron por triplicado para descartar cualquier tipo de error.

La Tabla V muestra que el porcentaje de germinación del *Brassica oleracea itálica* es menor al registrado por el *Raphanus sativus* y *Lactuca sativa*, quienes cumplen con las especificaciones reportadas por el fabricante (germinación > 85%).

Determinación de fitotoxicidad

Las figuras 2 y 3 presentan el efecto fitotóxico de los extractos acuosos de PM10 sobre la inhibición del crecimiento en raíz e hipocótilo en semillas a diferentes tratamientos.

El estudio encontró que los extractos acuosos del material particulado PM10, de las estaciones 2-460 y 2-447 (Figs. 2 y 3), presenta inhibición al crecimiento del hipocótilo para los diferentes tratamientos aplicados en las tres especies ensayadas, estos resultados reflejan los de García et. al, [10] donde a mayores concentraciones se registra una mayor inhibición al crecimiento. Esto podría atribuirse a la presencia de metales como el níquel, el cual resulta ser tóxico a concentraciones que oscilan entre 0,19 umol g⁻¹ y 0,85 umol g⁻¹ en peso seco de planta, e incluyen la inhibición del crecimiento de la raíz y la aparición de clorosis entre las venas de las hojas [19], otro posible efecto sería que el plomo inhibe la germinación de las semillas y retarda el crecimiento de las plantas, además presenta síntomas específicos, los cuales consisten en una disminución del porcentaje e inhibición de la germinación [20]. Un hallazgo novedoso se observa para el caso del *Raphanus sativus* y *Lactuca sativa*, en la estación 3-405, en el que a pesar de registrar las mayores concentraciones de metales pesados (Ni, Mn), el efecto fitotóxico se produce con los tratamientos al 10,0% y al 0,10% para el caso del *Raphanus sativus* y al 0,1% para la *Lactuca Sativa*. Este hecho podría atribuirse a que la estación se localiza a 300 m al sur del parque industrial donde se registran industrias de producción de hierro, acero y cerámica [21]. Un resultado que llama la atención es que la semilla más sensible a los tratamientos es *Lactuca sativa*, ya que todos los casos

Tabla IV
CARACTERIZACIÓN DEL PM10 EN LO REFERENTE A METALES PESADOS

Estaciones de Monitoreo de PM10						
Metales ng/m ³	1-423**	1-460*	2-447 **	2-460*	3-405**	3-425*
Cadmio	< 0,614	4,576	< 0,606	0,674	4,694	< 0,634
Manganeso	36,259	39,517	24,886	24,151	55,532	27,275
Níquel	9,833	18,719	39,453	42,685	62,401	27,910
Plomo	< 3,072	9,359	< 3,034	3,875	< 2,862	< 3,171

Concentraciones de metales pesados en tres sitios de monitoreo (**) estaciones con concentraciones de PM10 que varían entre (17,04 µg/m³ y 29,10 µg/m³) (*) estaciones con concentraciones de PM10 que oscilan entre (28,45 µg/m³ y 52, 44 µg/m³). Los códigos: 1-423 y 1- 460; 2-447 y 2-460; 3-405 y 3-425 corresponde a las estaciones: Escuela Ignacio Escandón (EIE), municipio (MUN) y Colegio Carlos Arízaga (CCA), respectivamente.

Fuente: Los autores

Tabla V
MEDIA DE LOS PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE LAS TRES ESPECIES, EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE PM10

Estaciones	Concentración	Brócoli	Rabano	Lechuga
1-423**	100	90	88	90
	10	88	88	88
	1	87	88	97
	0,1	83	88	90
1-460*	100	88	90	93
	10	87	88	90
	1	95	95	93
	0,1	78	90	92
2-447**	100	85	90	93
	10	82	88	95
	1	82	85	93
	0,1	82	85	93
2-460*	100	88	90	95
	10	82	88	95
	1	92	90	92
	0,1	83	87	88
3-405**	100	90	90	93
	10	85	87	92
	1	90	92	93
	0,1	87	88	90
3-425*	100	85	88	92
	10	90	90	88
	1	82	90	92
	0,1	78	88	90
Control	100	100	100	98
	10	100	100	98
	1	97	100	97
	0,1	100	100	100

Los códigos: 1-423 y 1-460; 2-447 y 2-460; 3-405 y 3-425 corresponden a las estaciones: Escuela Ignacio Escandón (EIE), municipio (MUN) y Colegio Carlos Arízaga (CCA), respectivamente.

Fuente: Los autores

Fuente: Los autores

Figure 1 consists of three panels (A, B, and C), each containing four box plots representing longitudinal growth (cm) for a specific species under different salinity levels (100%, 10%, 1%, and 0.1%). The x-axis for all plots is 'Estación' (Station), with categories: C, 1-423, 1-469, 2-469, 2-441, 3-423, and 3-469. The y-axis is 'Longitud (cm)'. The box plots show the median, quartiles, and range of growth for each station and salinity level. In general, growth is higher at lower salinity levels and varies by station. Panel A shows growth up to 6 cm, Panel B up to 10 cm, and Panel C up to 4 cm.

Fuente: Los autores

inhibieron el crecimiento del hipocótilo [13] [22]. La estación 2-447 inhibe el crecimiento de la raíz al 100%, 10% y 1% del *Brassica oleracea itálica*, para el caso del *Raphanus sativus* al 10%, 1% y 0,1%, finalmente, para el caso de *Lactuca sativa* al 0,1%, en esta última también la estación 2-460 y 3-405 producen el mismo efecto a concentraciones de 100% y 0,1%, respectivamente; esto se puede atribuir a la presencia de níquel. Al revisar la literatura no se encontraron estudios que evalúen la fitotoxicidad de este contaminante, razón por la cual no se conoce con certeza cuál es el componente del PM10 específico que afecte las especies vegetales estudiadas. En futuras investigaciones, se podrían utilizar sustancias puras que sean componentes del PM10, para evaluar la relación de cada una de ellas con el efecto inhibitorio. Se encontró también que a diferentes concentraciones se tiene un efecto estimulante mayoritario en la raíz, seguido del hipocótilo, tanto del brócoli, *Raphanus sativus* y *Lactuca sativa*. Lo que llama la atención es el resultado de la estación 2-447 la cual resultó ser la más crítica, ya que inhibió el crecimiento de raíz e hipocótilo en las tres semillas. Este comportamiento podría atribuirse a que la estación se encuentra localizada en el centro histórico (MUN), zona de elevado tráfico vehicular, lo cual permite suponer que existe una sinergia entre metales pesados contenidos en el PM10, muchos de los cuales no fueron analizados. Los resultados de esta investigación, utilizando semillas, indica una amplia variedad en respuesta a los metales, concordando con lo manifestado por Deng et. al y Lytle and Lytle [23] [24].

4. CONCLUSIONES

Las emisiones de material particulado PM10 causan severos daños, entre ellos la alteración en la fotosíntesis, modificaciones en el crecimiento y reproducción de las plantas. Se identificó que la especie *Lactuca sativa* presente mayor sensibilidad a los tratamientos del extracto acuoso de PM10. La estación localizada en el centro histórico de la ciudad resultó ser la más significativa, afectando las tres especies ensayadas, reportándose una mayor concentración de níquel y manganeso. Los tratamientos inhibieron en mayor porcentaje al hipocótilo, antes que a la raíz. Esta investigación es importante por los efectos asociados al PM10. Futuras investigaciones deben caracterizar

metales que no han sido considerados en este estudio, así como compuestos orgánicos que podrían estar presentes en los extractos acuosos. Se recomienda a las entidades de control ambiental, implementar programas de monitoreo continuo para valorar los efectos ocasionados a largo plazo y proporcionar información para elaborar un marco normativo en función de los metales pesados.

REFERENCIAS

- [1] D. Muñoz, A. Marcela, V. Paz, J. Jairo, P. Quiroz, and C. Mario, "Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud de adultos que laboran en diferentes niveles de exposición," *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, vol. 25, no. 2, pp. 85-94, julio - diciembre 2007.
- [2] M. Zuluaga, A. Valencia and I. Ortiz, "Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos," *Medicina UPB*, vol. 28, no. 1, pp. 33-41, enero-junio 2009.
- [3] M. García and H. Carreras, "Análisis de la genotoxicidad de material particulado recolectado en dos ciudades de la provincia de Córdoba, Argentina, mediante el ensayo de micronúcleos," *Theoria*, vol. 17, no. 1, pp. 33-40, abril 2008.
- [4] R. Troncoso, L. de Grange, and L. Cifuentes, "Effects of environmental alerts and pre-emergencies on pollutant concentrations," *Atmos. Environ.*, vol. 61, pp. 550-557, noviembre 2012. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.07.077>.
- [5] A. Astudillo, M. Ramírez, N. García, G. González, I. Gutiérrez, and N. Bailón, "Caracterización química del material particulado PM10 de la zona urbana de Cuenca- Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549," *Rev. toxicol*, vol. 32, no. 2, pp. 121-126, diciembre 2015.
- [6] Decreto Ejecutivo 3516, 2019. Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente: libro VI. Anexo 4. Norma de calidad de aire ambiente.
- [7] M. Villacrés, "Evaluación de la contaminación atmosférica de la ciudad de Ambato relacionada con el material particulado sedimentable", Tesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Biotecnología Ambiental, Riobamba, Ecuador, 2015.
- [8] E. Boldo, "Efecto de la exposición a PM2,5 sobre la mortalidad: Evaluación del impacto de las políticas públicas en la salud", Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, España, 2012.
- [9] M. Quinteros, "Evaluación de la fitotoxicidad del bio-transformado de imidacloprid en suelos de la comunidad el Milagro, Parroquia La Carolina, provincia Imbabura", Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, Imbabura, Ecuador, 2018.
- [10] N. García and M. Abad, "Análisis preliminar de la fitotoxicidad del material particulado sedimentable de la zona urbana de Cuenca," *Maskana*, vol. 6, no. 1, pp. 95-105, diciembre 2015.

- [11] E. Águila, O. Chang, Y. Cárdenas and N. Bernal, "Evaluación ecotoxicológica de extractos acuosos de plantas en semillas de rábano, lechuga y tomate," *Centro Agrícola*, vol. 40, no. 1, pp. 83-87, enero - marzo 2013.
- [12] R. Manrique, M. Ortiz and D. Reyes, "Pruebas de ecotoxicidad para establecer el potencial genotóxico del hipoclorito de sodio, mediante bulbos de cebolla *Allium cepa* L y semillas de lechuga *Lactuca sativa* L como bioindicadores," *ITECKNE*, vol. 8, no. 1, pp. 7-14, julio 2011.
- [13] M. Sobrero and A. Ronco, "Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga" In: G. Castillo, M. Díaz, Y. Pica, A. Ronco, C. Sobrero, G. Bulus, G. Feota, G. Forget and A. Sánchez-Bain (Eds.). *Ensayos toxicológicos y Métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México, pp.71-79, 2004.
- [14] L. Monroy, "Caracterización del material particulado PM10 y su efecto fitotóxico en las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), rábano (*Raphanus sativus*) y brócoli (*Brassica oleracea itálica*)," Tesis, Universidad de Cuenca, Escuela de Ingeniería Ambiental, Cuenca, Ecuador, 2017.
- [15] M. Sobrero, "Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnóstico", Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata, Argentina, 2010.
- [16] M. Lallana, J. Elizalde, C. Billard, V. Lallana, "Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* (L.): determinación de calidad de agua en Germination bioassay of *Lactuca sativa* (L.): to determine water quality in irrigation dams," *Rev. Facultad de Ciencias Agrarias*, vol. 10, no. 1, pp. 29-38, 2008.
- [17] European Environment Agency, "Air Implementation Pilot: Lessons learnt from the implementation of air quality legislation at urban level," Report no. 7. 2013.
- [18] J. Fagundo and C. Doria, "Niveles de metales en partículas atmosféricas en la zona minera de carbón, norte de Colombia", *ITECKNE*, vol. 14, no. 2, pp. 110-121, diciembre 2017. <http://dx.doi.org/10.15332/iteckne.v14i2.1765>.
- [19] J. Vargas, M. Martínez and R. Ortiz, "Efectos de metales pesados sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* L.," *Cienc. Nicolaita*, vol. 49, pp. 101-112, 2007.
- [20] R. Flores, "Efectos adversos de metales pesados en la agricultura de la cuenca baja del río Huaura-provincia Huaura 2017," *Rev. Cienc. Tecnol*, vol. 14, no. 4, pp. 119-131, diciembre 2018.
- [21] Agency For Toxic Substances and Disease Registry, "Manganese CAS # 7439-96-5," 2001.
- [22] D. Camarillo, M. Barajas and R. Rodríguez, "Evaluación de la fitotoxicidad de jales mineros en cuatro especies empleadas como bioindicadoras de metales pesados," *Rev. Int. Contam. Ambient*, vol. 31 no. 2, pp. 133-143, agosto 2015.
- [23] H. Deng, Z. Ye, and M. H. Wong, "Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China," *Environmental pollution*, vol. 132, no. 1, pp. 29-40, noviembre 2004. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.03.030>.
- [24] J. Little and T. Little, "Use of plants for Toxicity assessment of stuarine ecosystems," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 68-83, 2001.