



Original

Evaluación toxicológica del bioproducto IHPLUS® activado en larvas de *Artemia sp.*

Toxicological evaluation of the activated IHPLUS® bioproduct in *Artemia sp.* larvae.

Mirieisy Seijo Wals *, Osmany Marrero Chang *, Edisleidy Aguila Jiménez *, Zoe Alicia Castañedo Hernández *, Maykelis Díaz Solares **, Leonel Lazo Pérez ***

*Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5½. CP 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" (EEPFIH). Central España Republicana, CP 44280, Perico, Matanzas, Cuba.

***Departamento de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5½. CP 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

Correspondencia: mirieisys@uclv.edu.cu

Recibido: Septiembre, 2023; Aceptado: Octubre, 2023; Publicado: Enero, 2024.

RESUMEN

Antecedentes: El uso racional del agua y la aplicación de sistemas de tratamiento para las aguas residuales se presentan como alternativa para subsanar la contaminación de los ecosistemas acuáticos. El IHPLUS® activado constituye una alternativa para la biorremediación de fuentes hídricas contaminadas. **Objetivo.** determinar la toxicidad por exposición única del producto IHPLUS® activado en larvas de *Artemia sp.* **Métodos:** Se evaluó la toxicidad por exposición única del bioproducto IHPLUS® activado en larvas de *Artemia sp.* obtenidas de quistes incluidos en agua de mar artificial. Los grupos experimentales de larvas de *Artemia sp.* fueron expuestos por 24 horas a cinco concentraciones del producto en estudio y se compararon con un grupo control sin exposición. Se calculó la CL₅₀ del bioproducto y se estudió la influencia de factores que pudieran ser los responsables de la toxicidad/mortalidad, estos fueron la presencia o ausencia de micro-organismos y el pH. **Resultados:** La CL₅₀ del producto resultó 0,042% en agua de mar artificial, por lo que se clasifica como no tóxico para crustáceos. Se demostró que el IHPLUS® activado resultó tóxico a concentraciones superiores a 0,032% en larvas de *Artemia sp.*, bajo las condiciones del ensayo. El pH resultó ser el factor responsable en la producción de la toxicidad del bioproducto en *Artemia sp.* **Conclusión:** El IHPLUS® activado resultó no peligroso para crustáceos de ambientes marinos.

Palabras Clave: ambiente acuático, crustáceos, niveles tóxicos, pH, toxicidad (*Fuente: MESH*)

Como citar (APA) Seijo Wals, M., Marrero Chang, O., Aguila Jiménez, E., Castañedo Hernández, Z., Díaz Solares, M., & Lazo Pérez, L. (2024). Evaluación toxicológica del bioproducto IHPLUS® activado en larvas de *Artemia sp.* *Revista de Producción Animal*, 36(1). <https://rpa.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4596>



El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>, asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

ABSTRACT

Background: The rational use of water and the application of treatment systems for wastewater are presented as an alternative to remedy the contamination of aquatic ecosystems. The activated IHPLUS® constitutes an alternative for the bioremediation of contaminated water sources. The objective of the study was to determine the toxicity by single exposure of the activated IHPLUS® product in larvae of *Artemia* sp. **Methods:** Toxicity was evaluated by single exposure of the activated IHPLUS® bioproduct in *Artemia* sp. larvae obtained from cysts included in artificial seawater. The experimental groups of larvae were exposed for 24 hours to five decreasing concentrations of the product under study and were compared with a control group without exposure. The LC₅₀ of the bioproduct was calculated as well as the influence of factors that could be responsible for the toxicity/mortality was studied, these were the presence or absence of micro-organisms and pH. **Results:** The LC₅₀ of the product was 0,042% in artificial seawater, thus it is classified as non-toxic for crustaceans. It was shown that the activated IHPLUS® was toxic at concentrations higher than 0,032% in *Artemia* sp. larvae, under the test conditions. The pH turned out to be the responsible factor in the production of the toxicity of the bioproduct in *Artemia* sp. **Conclusion:** The activated IHPLUS® was not dangerous for crustaceans in marine environments.

Keywords: aquatic environment, crustaceans, toxic levels, pH, toxicity (*Source: MESH*)

INTRODUCCIÓN

El mal estado de los ecosistemas tiene una repercusión directa en muchos animales y plantas que viven en el agua y afecta a otras especies y a los seres humanos que necesitan agua limpia (EEA, 2021). Para mitigar esta problemática se aplican diferentes métodos, entre ellos la biorremediación, la que se ha convertido en una interesante y promisoría alternativa a las convencionales técnicas para el tratamiento de sustancias que contaminan el ambiente (Montenegro, 2019). El IHPLUS®, registrado como marca en 2011 por la OCPI (Oficina Cubana de Propiedad Industrial), inició la tecnología cubana basada en microorganismos eficientes (ME). Dichas producciones se han instalado en diferentes plantas de producción del bioproducto con múltiples usos, en la sanidad animal y vegetal, como probiótico, en la nutrición de cultivos, la eliminación de malos olores en instalaciones pecuarias y en la biorremediación (Suárez, 2015).

En el tratamiento de residuales líquidos, se destaca la eliminación de microalgas que causaban constantes tupidaciones en el sistema de riego y su aplicación en el lago del parque Josone, Varadero, Matanzas; con el proceso de biorremediación, mejoraron las concentraciones de los parámetros de calidad del agua (Palma y Cruz, 2021). Para la investigación y desarrollo de dicho producto resulta necesario estimar los posibles riesgos por exposición al humano y especies representativas de los ecosistemas donde se prevé sea aplicado.

En el caso de las evaluaciones a pesticidas microbianos la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos ha emitido un grupo de guías de ensayos armonizadas (US-EPA, OCSPP) para la investigación y desarrollo de pesticidas microbianos. Dentro de estas

metodologías están las guías de ensayos ecotoxicológicos y una de ellas es la de evaluación de la toxicidad en invertebrados acuáticos (EPA, 2023).

Actualmente, la *Artemia sp.*, invertebrado que habita en cuerpos acuáticos salinos, se utiliza para investigar la toxicidad de sustancias químicas, físicas o biológicas, así como el efecto de residuos o mezclas complejas. También se inserta como un ensayo de tamizaje en un programa de evaluación de toxicidad, para estudios de modelos de acción tóxica de sustancias, y estudios de la transferencia trófica de contaminantes (Persoone, 1987 y Artoxkit, 2014). Constituye uno de los biomodelos más empleados para caracterizar el impacto de la contaminación sobre ambientes acuáticos. Su característica de criptobiosis y euriplasticidad lo hace un organismo particularmente ventajoso con variadas aplicaciones. En las investigaciones fundamentales y aplicadas de ecotoxicología el uso de esta especie permite disponer de un biomodelo económicamente accesible, con estabilidad biológica, y extrapolabilidad interlaboratorios (Persoone, 1987).

La finalidad del estudio fue determinar la toxicidad por exposición única del producto IHPLUS® activado en larvas de *Artemia sp.*, organismo no cordado de ambientes acuáticos salinos, y de esta forma contribuir con datos importantes sobre las perspectivas de la utilización segura del mismo al interactuar con ecosistemas acuáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar donde se realizaron los estudios

El estudio se realizó en los laboratorios de toxicología y ecotoxicología del Departamento de Investigaciones Biológicas del Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Estos se realizaron entre el 12 de marzo del 2019 y el 9 de abril del mismo año.

Producto en estudio

Se evaluó una muestra de IHPLUS® activado, suministrada por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Esta consistió en el resultante de la fermentación líquida anaerobia de microorganismos nativos provenientes de una fermentación sólida que contenía bacterias aerobias y anaerobias, levaduras, hongos y lactobacilos, de origen natural, no manipulados genéticamente, utilizado como inóculo para la producción del fermentado líquido.

Además, se evaluó el biopreparado inactivado, el que se obtuvo mediante esterilización durante una hora (h) en autoclave Hirayama a 121°C y $1,216 \times 10^6$ Pa de presión. Todas las muestras fueron utilizadas recién preparadas y el ensayo se realizó a temperatura del laboratorio, de 22°C a 25°C.

Medio de cultivo

Se utilizó como medio de mantención de las larvas de *Artemia sp.* agua de mar artificial (AMA), la cual se preparó a partir de una mezcla de sales según la fórmula de (Dietrich y Kalle, 1957)

Estudio de toxicidad aguda

Se realizó un ensayo de toxicidad aguda en *Artemia sp.* mediante las metodologías de Artoxkit (2014), la guía ICT (2013) y el protocolo propuesto por (Banti y Hadjikakou, 2021). Se procedió a la obtención de larvas de *Artemia sp.* a partir de quistes desecados obtenidos de Argent Chemical Laboratories, Washington, USA, los que garantizaron óptimas condiciones de eclosión y poblaciones homogéneas de nauplios. La prueba se basó en la determinación de los efectos tóxicos producidos en larvas del crustáceo *Artemia sp.* tras una exposición al bioproducto IHPLUS® activado.

Durante este ensayo se expusieron, en tanteos iniciales, los nauplios de *Artemia sp.* a concentraciones del producto en estudio obtenidas por diluciones seriadas con factores de dilución 1:2 y 1:10. Posteriormente se realizó el ensayo con cinco diluciones, formadas mediante un factor de dilución, el cual permitió establecer 3 diluciones entre la mínima dilución que produjo el 100% de mortalidad y la máxima dilución que no produjo mortalidad. Dicho procedimiento permitió estimar la Concentración Letal Media (CL₅₀). En cada ensayo se incluyó un grupo control no expuesto, con la misma cantidad de larvas en AMA.

Las larvas se observaron mediante lupa o microscopio estereoscópico y se registró la mortalidad por grupos. Se consideró muerto el individuo incapaz de moverse por diez segundos. Se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad a partir del total de individuos expuestos. Se evaluó la mortalidad a las 24 horas de exposición.

En otro estudio se formaron grupos con la misma cantidad de larvas y réplicas para evaluar los posibles factores o parámetros que pudieran determinar o influenciar en la mortalidad de los organismos de ensayo. Para ello se evaluó una concentración específica de IHPLUS del 6%, bajo tres condiciones diferentes, ver tabla 1.

Tabla 1. Ensayos de toxicidad del IHPlus activado bajo diferentes condiciones.

Grupo	Concentración	Condición alterada	Influencia en la toxicidad
IHPLUS®	6%	-	Toxicidad real
IHPLUS® inactivado		Inactivación	Ausencia de microorganismos viables
IHPLUS® ajustado		pH ajustado a 7	pH
Control	-	-	-

El pH en la tercera variante fue ajustado a siete mediante adición de carbonato de sodio, Merck; medio por el cual se ajusta dicho parámetro químico en la preparación de AMA.

A cada grupo de todos los ensayos se le asignó al azar 40 larvas, distribuidas en cuatro réplicas de 10 individuos cada uno. Cada réplica de grupo permaneció en su respectivo pozo de placas de 24 pozos de polipropileno estériles. Dichas placas se identificaron en la tapa con marcador permanente mediante un código que permitiera realizar las lecturas a ciegas por el personal indicado.

El estudio se consideró válido si en el grupo control no ocurrió mortalidad de las larvas igual o mayor del 10%.

Cálculos y análisis

Se calculó el porcentaje de letalidad para cada grupo mediante. Con los datos obtenidos a diferentes concentraciones se confeccionó la curva dosis-respuesta y se calculó la Concentración Letal Media (CL₅₀) mediante ajuste no lineal a una curva Sigmoide utilizando el paquete estadístico Statística, v10.

Según los resultados obtenidos el bioproducto se clasificó mediante la metodología propuesta por el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) para peligros a corto plazo (agudo) (Naciones Unidas, 2015) y que se muestra a continuación:

Tabla 2. Esquema de clasificación de las sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático (crustáceos).

Categorías de clasificación para crustáceos	
Peligro a corto plazo (agudo)	
Categoría Aguda 1	$C(E)L_{50} \leq 1,00 \text{ mg/L}$
Categoría Aguda 2	$1,00 \text{ mg/L} < C(E)L_{50} \leq 10,0 \text{ mg/L}$
Categoría Aguda 3	$10,0 \text{ mg/L} < C(E)L_{50} \leq 100 \text{ mg/L}$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se consideraron válidas las pruebas debido a que no se produjo mortalidad en los grupos controles a las 24 horas post-exposición, ver Tabla 3.

Tabla 3. Mortalidad en los tanteos de concentraciones del IHPLUS® activado en larvas de *Artemia sp.*

Grupos	Dilución	Concentración (porcentaje)	Mortalidad (porcentaje)
Primer tanteo (dilución 1:2)			
1	1:2	50	100
2	1:4	25	100
3	1:8	12,5	100
4	1:16	6,25	100
5	1:32	3,125	100
1-I	1:2	50	100
2-I	1:4	25	100
3-I	1:8	12,5	100
4-I	1:16	6,25	100
5-I	1:32	3,125	100
Control	-	-	0
Segundo tanteo (dilución 1:10)			
6	1:10	0,1	100
7	1:100	0,01	100
8	1:1000	0,001	0
9	1:10000	0,0001	0
10	1: 100000	0,00001	0
6-I	1:10	0,1	100

Evaluación toxicológica del bioproducto IHPLUS® activado en larvas de *Artemia sp.*

7-I	1:100	0,01	100
8-I	1:1000	0,001	0
9-I	1:10000	0,0001	0
10-I	1: 100000	0,00001	0
Control	-	-	0

I: bioproducto inactivado

En estos primeros estudios se apreció que el producto IHPLUS® activado e inactivado induce mortalidad en el 100% de los nauplios de *Artemia sp.* hasta la dilución 1:100 (0,1%) en AMA. A concentraciones del 0,01% y superiores no ocurrió muerte en las larvas, comportamiento similar a cuando se evaluó el producto inactivado.

Los resultados del ensayo principal donde se evaluaron cinco concentraciones entre un 0,1% y 0,01% del producto aparecen en la tabla 4. Los resultados de mortalidad en función de la concentración del IHPLUS® activado arrojaron que la CL₅₀ se estimó en un 0,042%, equivalente a 420 mg/L, en un medio salino como el AMA.

Tabla 4. Resultados del estudio de toxicidad aguda del IHPLUS® activado en *Artemia sp.*

Grupos	Factor de dilución	Concentración (porcentaje)	Mortalidad (porcentaje)	CL ₅₀
1	1,78	0,01	100	0,042 % (420 mg/L)
2		0,056	100	
3		0,032	0	
4		0,018	0	
5		0,001	0	
Control	-	-	0	

Model is: $M=100 \cdot C^{**n} / (C_{150}^{**N} + C^{**N})$ (Spreadsheet1)

Dep. Var. : MLevel of confidence: 95.0% (alpha=0.050)

	Estimate	Standard	t-value	p-level	Lo. Conf	Up. Conf
n	30,94473	3093,743	0,010002	0,992647	-9814,73	9876,616
Cl50	0,04231	1,338	0,031622	0,976760	-4,22	4,300

Respecto a la toxicidad del producto con variaciones en las condiciones de la mezcla para elucidar el factor responsable de la misma se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de toxicidad del IHPLUS® activado en *Artemia sp.* bajo diferentes condiciones.

Grupo	Concentración	Condición alterada	Mortalidad (porcentaje)
IHPLUS®	6%	-	100
IHPLUS® inactivado		Inactivación	100
IHPLUS® ajustado		pH ajustado a 7	0
Control	-	-	0

De los resultados anteriores se infirió que el principal factor que debe producir la toxicidad del producto debe ser el pH. El pH del IHPLUS® activado resulta muy bajo para permitir la viabilidad de las larvas del crustáceo en el medio de ensayo. Al determinar el pH en las diferentes variantes, resultó que el producto inalterado tuvo 3,2 y el producto al 6% tuvo 3,9. Cuando se inactivó la fracción biótica del producto la mortalidad persistió, pero cuando se ajustó el pH del producto a nivel neutro, pH más cercano al medio AMA, no ocurrió mortalidad en las larvas.

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en el experimento y de acuerdo con el sistema de clasificación para peligros a corto plazo (agudo) para el medio ambiente acuático (Naciones Unidas, 2015), el producto IHPLUS® no puede ser clasificado dentro de las categorías de toxicidad aguda debido a que el valor de la CL₅₀ resultó muy superior a los niveles de categorías de peligro a corto plazo, los que clasifican a la sustancias hasta 100 mg/L y en el producto en estudio dicha determinación resultó 420 mg/L. Los resultados clasifican al producto como no peligroso en exposición aguda para organismos acuáticos, aunque se deben considerar los resultados con otros organismos para establecer una clasificación de peligro para el medio ambiente acuático.

En la bibliografía no se encuentran reportes sobre la toxicidad de productos de origen similar al evaluado en *Artemia* sp. Sin embargo, el uso de ME frente al tratamiento de diversas fuentes de vertimiento de aguas al medio ambiente, donde habitan organismos cercanos filogenéticamente a *Artemia* sp., ha sido ampliamente estudiado. Como se aprecia en la tabla 6 varios autores recomiendan utilizar este tipo de producto en diluciones entre 1:1000 y 1:10000, dichas concentraciones al ser evaluadas en nuestros estudios (Tabla 2), no produjeron mortalidad en *Artemia* sp.

Tabla 6. Reportes del uso de ME en el tratamiento de aguas.

Concentraciones empleadas	Usos	Autores
1L ME/1000 L Agua (1:1000)	Tratamientos de aguas residuales por biorremediación	Mendietta L. (2015)
Dosis de activación: 1L ME/m ³ Agua (1:1000) Dosis de mantenimiento: 1L ME/10 000 L Agua (1:10 000)	Tratamiento de lagunas	OISCA (2009)
Dosis de activación: 1L ME/m ³ Agua (1:1000) Dosis de mantenimiento: 1L ME/10 000 L Agua (1:10 000)	Efluentes de la industria de la destilería	Karthick. S (2014)
1 mL ME / 1000 mL agua residual (1:1000)	Agua Residuales de Granja Porcina	Toc R.M. (2012)

Nota. ME: microorganismos eficientes

CONCLUSIONES

El bioproducto IHPLUS® activado resulta tóxico a concentraciones superiores a 320 mg/L en larvas de *Artemia* sp., bajo las condiciones del ensayo.

El producto de origen microbiano IHPLUS® activado resulta no peligroso debido a que la CL₅₀ fue de 420 mg/L en *Artemia sp.*

La acidez del pH resulta el principal factor responsable de la toxicidad del producto IHPLUS® activado en el biomodelo *Artemia sp.*

REFERENCIAS

- Artoxkit, M. (2014). *Artemia Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Waters. Standard Operational Procedure.* Microbiotests, Mariakerke-Gent. Creasel, Deinze, Bélgica. 22 pp. <https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/artemia-toxicity-testartoxkit-mstandard-operating-procedure.pdf>
- EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos). (2023). Pesticides. Regulating Pesticides. What are Biopesticides? TSG Consulting. <http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/whatarebiopesticides.htm>
- Banti, C.N., & Hadjikakou, S.K. (2021). Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay. *Bio Protoc.*, 11(2), e3895. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7952950/>
- Dietrich, G., & Kalle, K. (1957). *Allgemeine Meereskunde. Eine Einführung in die Ozeanographie* (pp. 42-43). Berlin, Germany: Gebriider Barntraeger.
- EEA (European Environment Agency). (2021). La vida subacuática está expuesta a graves amenazas. European Environment Information and Observation Network. Environmental information systems. <https://www.eea.europa.eu/es/senales/senales-2018-el-agua-es-vida/articulos/la-vida-subacuatica-esta-expuesta>
- ICT. (2013). Acute toxicity test on brine shrimp (*Artemia sp.*). Laboratory work no. 6. Laboratory of Ecotoxicology and LCA. Department of Environmental Chemistry, ICT Prague. <https://www.yumpu.com/en/document/view/11545216/acute-toxicity-test-on-brine-hrimp-artemia-salina>
- Karthick, S., Shunmugaraj, M., Arvind, R.S., & Francis, A.L. (2014). Evaluation of Phytotoxicity of Effective Microorganism (EM) Treated Distillery Industry Effluent. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(2), 587-592, <https://www.researchgate.net/publication/265729263>
- OISCA. (2009). *Manual Práctico de Uso de EM. Proyecto de Reducción de Pobreza y Mejora de las Condiciones Higiénicas de los Hogares de la Población Rural de Menores Recursos.* Banco Interamericano de Desarrollo - Convenio Fondo Especial de Japón / BID ATN/JO-10792 UR. OISCA, BID, Uruguay. Edición N° 1. Julio. 37 pp. https://www.emuruguay.org/images/Manual_Practico_Uso_EM_OISCA_BID
- Mendietta, L., & Garance, L. (2015). *Tratamiento de aguas residuales por Biorremediación.* Liceo DR. Medulio Pérez Fontana Nueva Palmira. Colonia. 27 pp. <http://www.liceopalmira.edu.uy/Ecoagua.pdf>

- Montenegro, S., Pulido, S., & Calderón, L. (2019). Prácticas de biorremediación en suelos y aguas. Grupo de Investigación: CIAB, Producción Sostenible. Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente. Sello Editorial UNAD. Bogotá, Colombia. 49 pp. <https://doi.org/10.22490/notas.3451>
- Naciones Unidas. (2015). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA). Sexta edición revisada. ST/SG/AC.10/30/Rev.6. Nueva York y Ginebra. https://unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev6sp.pdf
- Palma García, J.M., & Cruz Uribe, J.F. (2021). Tecnologías sociales en la producción pecuaria de América Latina y el Caribe. ISBN digital: 978-607-8549-90-0. Universidad de Colima. México. 274 pp. http://www.ucol.mx/content/publicacionesenlinea/adjuntos/Tecnologias-Sociales DIGITAL_504.pdf
- Persoone, G., & Wells, P. (1987). Artemia in aquatic toxicology: a review. Artemia Research and its Applications. Vol. I. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology. P. Sorgeloos D. A. Bengtson, W. Decler, and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 380 p. <https://www.vliz.be/imisdocs/publications/ocrd/134002.pdf>
- Suárez, J. (2015). Producción integrada de alimentos y energía a escala local en Cuba: bases para un desarrollo sostenible. *Pastos y Forrajes*, 38(1), 3-10. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403942015000100001&lng=es&tlng=es
- Toc, R.M. (2012). Efecto de los Microorganismos Eficientes (ME) en las Aguas Residuales de la Granja Porcina de Zamorano, Honduras. (Tesis Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura. Zamorano. Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. Universidad de Honduras). <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/d82d-4672-d13a-4c9b-9731-c66827b30d2b/content>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: MSW, OMC, EAJ, ZACH, MDS, LLP; análisis e interpretación de los datos: MSW, OMC, EAJ, ZACH, MDS, LLP; redacción del artículo: MSW, OMC, EAJ, ZACH, MDS, LLP.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.