



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“ESTUDIO DEL RIESGO ECOTOXICOLÓGICO DEL SULFATO DE COBRE,
HIPOCLORITO SÓDICO Y VERDE DE MALAQUITA UTILIZANDO
COMO BIOINDICADOR *Artemia franciscana*”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTADA POR:

p. Q.F.B. VERÓNICA ORTIZ MANJARREZ

DIRIGIDA POR:

D.C. MA. CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO

MORELIA, MICHOACÁN

JUNIO, 2019



DEDICATORIA.

A mi familia por tanto apoyo y comprensión al momento de estar para mí en las buenas y en las malas, por ser mi inspiración, por darme las herramientas y las ganas para querer salir adelante por mí misma, y más que nada por creer en mí a pesar de tantas equivocaciones, este logro es gracias a ustedes, “los quiero mucho”.

A mi padre por darme todo lo que necesitaba y más, esta va por ti, mi vida completa me diste el ejemplo de ser la mejor persona de dar todo y no querer nada a cambio, quisiera que me hubieras visto logrando todo lo que siempre quisiste para mí pero hoy sé que desde el cielo me cuidas y estarás orgulloso de mi, eso te lo juro “te amo y siempre lo haré”.

A mi esposo y a mi hija por ser la razón de mis fuerzas, de mis ganas de salir adelante y no dejarme sola en ningún momento, “son la razón de mi vivir, los amo”.

A todas las personas que estuvieron presentes en todo mi camino para llegar a ser alguien en la vida, en especial a los amigos, compañeros, profesores de la etapa tan bonita que me tocó vivir en la universidad.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres por darme todo el amor del mundo y a la vez la educación para ser la persona que ahora soy, y de lo cual estoy muy orgullosa, sé que tal vez no hice las cosas como ustedes esperaban, pero una cosa si les prometo, lo hare, lo alcanzare sea lo que se me imponga en el camino y con la mejor actitud porque se ahí estarán ustedes para mi, esperando ver su sueño cumplido, ver crecer y superarse a su gordita, con mi madre a mi lado y mi padre desde el cielo. “Gracias por tanto los amo”.

A mi hermana Alejandra por demostrarme que el estudio no es tan fácil, pero con mucho esfuerzo y dedicación se obtienen buenos resultados.

A mi hermano Daniel por creer en mí y en mis conocimientos al pedirme ayuda con alguna que otra duda. Gracias por enseñarme que se puede ser el mejor alumno.

A mi abuelita y a mi tía Rebeca por ser parte de mí vida desde mi niñez y por todo el apoyo brindado, con solo el objetivo de verme feliz y triunfando.

Quiero agradecer a mi esposo, al amor de mi vida, por llegar en el momento más difícil de mi vida y, darme las fuerzas y el apoyo necesario para salir adelante. Por quererme como nadie

más lo hará, con mis virtudes y defectos, agradezco que estés tan feliz de tener una mujer con ganas de superarse, con metas en la vida y que además te sumes a cada una de ellas, “te amo chaparrito”.

A mi hija Aurora, eres la razón de mis ganas de vivir, de sobresalir, y de luchar por tu amor, tu bienestar y por tu futuro, “crece mi niña, mami se está preparando para darte lo mejor, eso te lo prometo, te adoro chaparrita”.

Me gustaría agradecer sinceramente a mi asesora de Tesis la Doctora Carmen por darme la oportunidad cuando más la necesite, y creer en mí, en mi trabajo y por su confianza, consejos y orientación en todo mi proceso para llevar a cabo mi Tesis, “es la mejor la quiero mucho”.

También me gustaría agradecer a mi sensei, Alondra porque sin ti estaría perdida en el mundo de los tesistas, muchísimas gracias por compartir tu conocimiento y ayudarme en todo lo que te fuera posible, siempre lo tendré muy presente, “eres una persona increíble”.

A mis seres queridos y amigos por darme los mejores momentos en esta etapa de mi vida, gracias por tantas risas, abrazos, sin ellos el camino no hubiera sido tan especial.

*Vamos, vamos, no aflojes, cierra con todo, y cuando llegues a la meta no pares, sigue
trotando (Rodolfo Ortiz)*

INDICE.

ABREVIATURAS.	VI
GLOSARIO.	VII
RESUMEN.	XII
ABSTRACT.	XIII
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1. Contaminación del agua por plaguicidas y desinfectantes.	8
2.1.1. Compatibilidad de las mezclas de plaguicidas y desinfectantes.	10
2.1.2. Sulfato de cobre	13
2.1.2.1. Mecanismo de acción tóxica.	16
2.1.3. Verde de malaquita.	19
2.1.3.1. Mecanismo de acción tóxica.	23
2.1.4. Hipoclorito sódico.	25
2.1.4.1. Mecanismo de acción tóxica.	27
2.2. Aplicación de bioensayos.	31
2.2.1. Tipos de bioensayos.	36
2.3. Bioindicadores y la <i>Artemia</i>	37
2.3.1. Biología y ecología de la <i>Artemia franciscana</i>	40
2.3.2. Morfología y ciclo de vida.	42
2.3.3. <i>Artemia Franciscana</i>	47
3. Justificación.	48
4. Hipótesis.	49
5. Objetivo general.	49
5.1. Objetivos específicos.	49
6. Material y métodos.	50
6.1. Sustancia de ensayo.	50
6.2. Agua marina.	50
6.3. Material biológico.	50

6.4.	Determinación de mortalidad en <i>Artemia franciscana</i> .	51
6.5.	Análisis de datos.	52
7.	Resultados.	52
7.1.	Respuesta individual del sulfato de cobre, verde de malaquita e hipoclorito sódico.	52
7.2.	Resultados de las mezclas de verde de malaquita, hipoclorito sódico y sulfato de cobre.	56
7.2.1.	Mezclas binarias con respecto a las concentraciones utilizadas en Acuicultura.	62
7.2.2.	Comparación múltiple por ANOVA Test de Tukey.	62
8.	Discusión.	67
9.	Conclusión.	75
10.	Recomendación.	76
11.	Bibliografía.	76

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Representación del ecosistema acuático.....	5
Figura 2. Contaminación del agua.....	6
Figura 3. Estructura del sulfato de cobre.....	13
Figura 4. Reacción de Fenton respecto al ion cobre.....	17
Figura 5. Posibles interacciones de iones metálicos en la inducción de estrés oxidativo e influencia en la actividad de la proteína.....	18
Figura 6. Estructura del verde de malaquita.....	20
Figura 7. Fórmula estructural del verde de malaquita, su forma de carbinol y su metabolito verde de lecomalaquita.....	22
Figura 8. El verde de malaquita afecta la situación redox de las células tumorales, generando cantidades importantes de radicales libre (también llamadas especies oxigenadas reactivas, ROS).....	25
Figura 9. Estructura del hipoclorito sódico.....	26
Figura 10. Reacción de equilibrio dinámico del hipoclorito de sodio.....	28
Figura 11. Reacciones del hipoclorito sódico en el tejido orgánico.....	28
Figura 12. Ruta y bioacumulación de los metales pesados en el ambiente costero y lagunar. M^{+n} ión metálico libre, M^{+n} m pares iónicos, M-R complejos metálicos.....	40
Figura 13. Morfología de la <i>Artemia</i>	42
Figura 14. Diferencias entre el macho y la hembra de la <i>Artemia</i>	43
Figura 15. Desarrollo del quiste de <i>Artemia</i> desde la incubación en agua de mar (AM) hasta la liberación del nauplio.....	44
Figura 16. Crecimiento progresivo de las <i>Artemias</i>	46
Figura 17. Ciclo de vida de la <i>Artemia franciscana</i>	46
Figura 18. A: Incubación de los quistes de <i>A. franciscana</i>	51

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del sulfato de cobre.....	13
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del verde de malaquita.....	20
Tabla 3. Propiedades físicas y químicas del hipoclorito sódico.....	26
Tabla 4. Criterios para la selección de pruebas biológicas en el laboratorio para la evaluación toxicológica.....	34
Tabla 5. Taxonomía y biogeografía de <i>Artemia</i>	40
Tabla 6. Índices de toxicidad (CL ₅₀ (24 h) y 24 h-NOEC) de los tres compuestos expuestos en forma individual sobre <i>A. franciscana</i>	53
Tabla 7. Índice de Combinación e Índice de Reducción de Dosis (DRI) en mezclas de los tres compuestos.....	56
Tabla 8. Mezclas binarias con respecto a las concentraciones utilizadas a Acuicultura.....	62
Tabla 9. Concentraciones a la que se trabajaron de cada compuesto con su respectiva media y desviación estándar.....	63
Tabla 10. Total de concentraciones de los tres compuestos con su respectiva media y desviación estándar, y sus ecuaciones.....	64
Tabla 11. Nivel de significancia para cada una de las concentraciones de las mezclas de NaClO/CuSO ₄ , NaClO/VM, CuSO ₄ /VM con su respectivo valor de P.....	65
Tabla 12. CL ₅₀ del cobre a 24 h de exposición sobre diferentes especies acuáticas.....	69
Tabla 13. CL ₅₀ a 24 h* y 96 h de exposición del verde de malaquita (MG) sobre diferentes organismos acuáticos.....	71
Tabla 14. Toxicidad del cloro en organismos acuáticos.....	72
Tabla 15. Clasificación propuesta por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) para categorizar a las sustancias en ambiente acuático.....	73

ÍNDICE DE GRAFICOS.

Gráfico 1. Relación Concentración-Respuesta lineal del verde de malaquita sobre nauplios de 24 h de <i>Artemia franciscana</i>	54
Gráfico 2. Relación Concentración-Respuesta lineal del NaClO sobre nauplios de 24 h de <i>Artemia franciscana</i>	55
Gráfico 3. Relación Concentración-Respuesta lineal del sulfato de cobre sobre nauplios de 24 h de <i>Artemia franciscana</i>	55
Gráfico 4. Mezcla de CuSO ₄ /VM.....	57
Gráfico 5. Mezcla de CuSO ₄ /NaClO.....	57
Gráfico 6. Mezcla de VM/NaClO.....	58
Gráfico 7. Comparación de las 3 mezclas binarias.....	58

ÍNDICE DE POLIGONOGRAMA.

Poligonograma de efecto 1. Respuesta antagónica al 10% de efecto.....	59
Poligonograma de efecto 2. Respuesta antagónica en todas las mezclas al 25% de efecto.....	60
Poligonograma de efecto 3. Respuesta sinérgica y antagónica al 50% de efecto.....	60
Poligonograma de efecto 4. Respuesta sinérgica y antagónica al 75% de efecto.....	61
Poligonograma de efecto 5. Respuesta sinérgica y antagónica al 95% de efecto.....	61

ABREVIATURAS.

ANOVA: Análisis de varianza.

CL₅₀: Concentración Letal 50%.

COP's: Compuestos Orgánicos Persistentes.

DRI: Índice de reducción de dosis.

EPA: Agencia de Protección Ambiental

FDA: Food and Drug Administration, en español Agencia de Alimentos y Medicamentos.

IC: Índice de Combinación.

ISO: Organización Internacional de Normalización

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, en español Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

MG: Malachite Green, en español verde de malaquita VM.

NOEC: Concentración sin Efecto Observado

ROS: Reactive Oxygen Species, en español Especies de Oxígeno Reactivas.

OC: Compuestos organoclorados.

GLOSARIO.

Absorción (biológica). Proceso de entrada o transporte, activo o pasivo, de una sustancia al interior de un organismo; puede tener lugar a través de diferentes vías

Acumulación. Sucesivas retenciones de una sustancia por un organismo diana, un órgano o una parte del medio ambiente, que conducen a un aumento de la cantidad o la concentración de la sustancia en los mismos.

Adaptación. Cambios en un organismo como respuesta a variaciones de las condiciones del ambiente que se producen sin ninguna alteración irreversible del sistema biológico y sin exceder la capacidad normal de respuesta (homeostasis).

Aguas residuales. Son las aguas de composición variada provenientes de las descargas municipales, industriales, comerciales, agrícolas pecuarias, domésticas y en general de cualquier otra.

Agudo. Exposiciones o efectos a corto plazo. En toxicología experimental, estudios de corta duración, normalmente de 24 h, o de dos semanas o menos, iniciados por la administración de una dosis única.

Antagonismo. La respuesta a una combinación de dos o más productos químicos es menor que la suma de las respuestas individuales esperadas. (a) Funcional: se produce cuando dos productos químicos se contrarrestan entre sí produciendo efectos opuestos sobre la misma función fisiológica. (b) Químico: reacción entre dos compuestos que generan un producto menos tóxico.

Bioacumulación. Aumento progresivo de la cantidad de una sustancia en un organismo o parte de él, como consecuencia de que el ritmo de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar la sustancia. Las sustancias bioacumulables alcanzan concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico.

Biodegradación. Destrucción in vivo o in vitro de una sustancia, por acción enzimática. Puede caracterizarse como: 1. Primaria. La alteración de la estructura

química de la sustancia que supone la pérdida de una propiedad específica. 2. Aceptable desde el punto de vista ambiental. Se eliminan propiedades indeseables del compuesto. 3. Total. La sustancia se transforma completamente en moléculas o iones simples (como dióxido de carbono, metano, nitrato, amonio, agua, etc.).

Biodisponibilidad. Proporción de la dosis que una sustancia absorbida por cualquier vía alcanza en la circulación sistémica.

Bioensayo. Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia (tóxico, toxina, hormona, antibiótico, etc.) mediante la medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada.

Biomagnificación. Secuencia de procesos que conducen a aumentar la concentración de una sustancia en un organismo con respecto a la del medio que se lo ha aportado. Acumulándose de forma creciente a lo largo de la cadena trófica. Se suele aplicar a los ecosistemas más que a los individuos.

Biotransformación. Reacciones que convierten los tóxicos en especies químicas distintas que pueden ser menos o más tóxicas que el compuesto original.

Cadena alimentaria (cadena trófica). 1. Secuencia de transferencia de materia y energía en forma de alimento de organismo en organismo en niveles tróficos ascendentes o descendentes. 2. Serie de organismos que se alimentan unos de otros, en cuya sucesión se transmiten y concentran, entre otras, sustancias tóxicas.

Concentración. Cantidad de una sustancia, expresada en peso o en moles (S), por unidad de peso o volumen del medio en que se encuentra ($C=S/Kg$; $C=S/L$).

Concentración efectiva (CE). Proporción de una sustancia en un medio que causa un determinado efecto en un sistema dado; la CE_{50} es la concentración que causa el 50% del efecto máximo.

Concentración letal (LC). Proporción de una sustancia tóxica en un medio, que causa la muerte después de un cierto período de exposición.

Concentración letal media (CL₅₀). Concentración calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

Concentración-respuesta, curva (curva dosis-respuesta). Gráfico que relaciona la concentración de la exposición y la proporción de individuos de la población que manifiesta un efecto determinado.

Concentración sin efecto observado (NOEC). Máxima concentración en términos del porcentaje, a la cual los organismos de ensayo son expuestos y no causa un efecto adverso determinado bajo condiciones idénticas a las de exposición.

Contaminante. 1. Agente microbiano indebidamente presente en un medio. 2. Impureza menor presente en una sustancia. 3. Material extraño inadvertidamente añadido a una muestra antes o durante el análisis químico o biológico. 4. Componentes indeseables del medio ambiente.

Curva dosis-respuesta. Expresión gráfica de la relación entre la dosis y la proporción (%) de los individuos de una población que experimentan o no un efecto determinado.

Dosis. Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24 h.

Ecosistema acuático. Es la unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí y de estos con el ambiente acuático en un espacio y tiempo determinado.

Efecto. Cambio biológico, tanto en organismos individuales como a niveles superiores de organización; se relaciona con la exposición a un xenobiótico.

Efluente. Líquido, sólido o gas emitido o descargado desde una fuente al medio ambiente.

Ensayos. 1. En Toxicología analítica: análisis cualitativo o cuantitativo por aplicación de métodos establecidos y la comparación de los resultados con estándares previstos. 2. En Toxicología experimental: evaluación de los efectos tóxicos potenciales de las sustancias mediante su aplicación, a diferentes dosis, a organismos apropiados o sistemas biológicos por vías adecuadas de exposición o administración.

Ensayo de toxicidad. Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y condiciones definidas.

Ensayo de toxicidad aguda. Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto tiempo después de una dosis única de una sustancia, o de varias dosis administradas en 24 h.

Índices de toxicidad. Expresan los resultados de diferentes ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica a la muestra.

Peligro. Posibilidad de que un agente produzca efectos dañinos, a causa de sus propiedades específicas y a las circunstancias y grado de la exposición.

Riesgo. Probabilidad de que se produzcan efectos adversos o daños por exposición a un agente tóxico, a causa de las propiedades inherentes del mismo y a las circunstancias o grados de la exposición.

Sensibilidad especie-específica. Características cualitativas y cuantitativas de respuesta a sustancias potencialmente tóxicas que son distintivas de especies particulares de organismos.

Sinergismo. Efecto que se produce cuando los efectos de la combinación de dos productos químicos son mucho mayor que la suma matemática de sus efectos en forma individual

Toxicidad. Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Toxicidad aguda. Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 d) después de la administración de una dosis única o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 h.

Tóxico. Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales.

Xenobiótico. Cualquier sustancia sintetizada químicamente que interactúa con un organismo produciendo un efecto adverso sobre el organismo.

RESUMEN.

La presencia de una alta concentración de plaguicidas y desinfectantes en el medio acuático es causada principalmente por la actividad humana. Tales elementos tóxicos llegan al mar a partir de fuentes de residuos urbanos, agrícolas o industriales, que pueden permanecer en suspensión en el agua, ser incorporados por la fauna acuática. El peligro de estos elementos depende de la concentración y la combinación con otros compuestos presentes en el medio. Teniendo en cuenta que actualmente hay pocos estudios sobre la toxicidad de la mezcla de estos compuestos, en esta investigación se determinó el efecto toxicológico agudo del sulfato de cobre, hipoclorito sódico y el verde de malaquita en su forma individual y mezcla, utilizando *Artemia franciscana* (nauplios de 24 h) como bioindicador, ya que son organismos representativos de los primeros niveles de la cadena trófica. La determinación se realizó mediante ensayos de toxicidad durante un período de 24 h, para calcular la concentración de los compuestos tóxicos que produce la muerte del 50% de la población expuesta, que se expresa como la concentración letal media (CL_{50}).

Los valores obtenidos de la CL_{50} muestran que el hipoclorito sódico (CL_{50} de 0.0046 mg/L) seguido del sulfato de cobre (CL_{50} de 13.74 mg/L) fue más tóxico que el verde de malaquita (CL_{50} de 8.32 mg/L). Por otra parte, la mezcla de ambos compuestos mostraron efectos para la mezcla de cobre con verde de malaquita al inicio fue fuertemente antagonista ya que el Índice de combinación (IC) de las primeras es mayor a 1, pero, a efectos mayores (95%) la respuesta fue sinérgica (es decir, menor a 1), mientras que para la mezcla de sulfato de cobre con hipoclorito de sodio la respuesta fue al inicio aditiva (es decir, IC=1) pero conforme se incrementa se volvió levemente antagonista. Con respecto al verde de malaquita e hipoclorito de sodio sucede que a efectos bajos se presentó antagonismo teniendo un IC mayor a 1, mientras que a efectos máximos la respuesta fue un sinergismo elevado con un IC menor a 1.

Palabras clave: Toxicidad aguda, *Artemia franciscana*, Sulfato de cobre, verde de malaquita, hipoclorito sódico, plaguicidas y desinfectantes.

ABSTRACT.

The presence of a high concentration of pesticides and disinfectants in the aquatic environment is mainly caused by human activity. Such toxic elements reach the sea from sources of urban, agricultural or industrial waste, which can remain in suspension in the water, being by aquatic fauna. The danger of these elements depends on the concentration and the combination with other compounds present in the medium. Taking into account that there are currently few studies on the toxicity of the mixture of these compounds, in this investigation the acute toxicological effect of copper sulphate, sodium hypochlorite and malachite green in its individual form and mixture was determined, using *Artemia franciscana* (nauplii of 24 h) as a bioindicator. The determination was made by toxicity tests over a period of 24 h, to calculate the concentration of the toxic compounds that causes the death of 50% of the exposed population, and expressed as the mean lethal concentration (LC₅₀).

The values obtained from LC₅₀ show that sodium hypochlorite (LC₅₀ of 0.0046 mg/L) followed by copper sulfate (LC₅₀ of 13.74 mg/L) was more toxic than malachite green (LC₅₀ of 8.32 mg / L). The mixture of copper with malachite green at the start was strongly antagonistic but, for greater effects (95%) the response was synergistic, mixture of copper sulphate with sodium hypochlorite the response was at the additive but it became slightly antagonistic. Regarding the malachite green and sodium hypochlorite, effects antagonism while for maximum effects the response was synergism.

Keywords: Acute toxicity, *Artemia franciscana*, copper sulfate, malachite green sodium hypochlorite, pesticides and disinfectants.

1. Introducción.

En la actualidad, gran cantidad de productos químicos y farmacéuticos son producidos y usados en grandes volúmenes en la acuicultura a nivel mundial; ya que uno de los principales problemas en esta industria son las enfermedades involucradas con su manejo que elevan los costos (Subasinghe, 2009).

Los principios generales relativos a la desinfección de establecimientos de acuicultura implican la aplicación de estos tratamientos químicos a concentraciones adecuadas, y durante periodos de tiempo adecuados, para matar todos los microorganismos patógenos que, de lo contrario, llegarían a contaminar los sistemas de agua circundantes. Dado que la toxicidad inherente a los desinfectantes impide que puedan ser utilizados de forma segura en sistemas de aguas abiertas, solo puede aplicarse desinfección de forma razonable a viveros y a las instalaciones de los propios viveros y de estanques.

La toxicidad de estas sustancias en el medio acuático varía según las especies y su estado de desarrollo (huevo, alevín, adulto) así como también del compuesto químico y las características fisicoquímicas del medio (oxígeno, temperatura, pH, entre otros).

Esta toxicidad es la razón por la que algunos protocolos para la desinfección de huevos de peces y de tratamientos para combatir las enfermedades de origen fúngico y bacteriano, incluyen soluciones o fármacos veterinarios como el verde de malaquita, desinfectantes como el hipoclorito de sodio y sales metálicas como el sulfato de cobre, entre otras (Chambel et al., 2014) y que, en algunos países como México, son legales y de uso regular.

Sobre el verde de malaquita, este es usado ampliamente en la industria de la acuicultura desde 1933 para el tratamiento de problemas causados por protozoarios y hongos (Bergwerff y Scherpenisse, 2003; Srivastava et al., 2004). Sin embargo, existe gran variedad de literatura que ha confirmado que el verde de malaquita es un carcinogénico potencial, teratogénico y mutagénico; por ello, ha sido prohibido por la

FDA (Food and Drug Administration) para su uso en Estados Unidos, Canadá, la Unión Europea y algunos otros países como Inglaterra y Chile (Eissa et al., 2013).

En cambio, el sulfato de cobre (CuSO_4) es un alguicida aprobado por la EPA (U.S.- Environmental Protection Agency) para uso en acuicultura. Aunque no está aprobado por la FDA como agente terapéutico, es usado masivamente para el control de parásitos protozoarios en especies acuáticas (Straus, 2003), así como para disminuir la proliferación de fitoplancton en aguas eutróficas (aguas enriquecidas en nutrientes) (Mazon et al., 2002).

La amplia utilización de estos desinfectantes está originando un importante factor de riesgo, ya que, si estos pasan como vertidos al agua pueden alcanzar zonas fluviales, y por sus características toxicológicas y peligrosas pasar al medio acuático, originando efectos sobre las poblaciones de organismos presentes en dicho medio, llevando a un efecto mayor afectando a estuarios y ambientes salinos costeros. Para estudiar dichos problemas y poder evitarlos se llevan a cabo ensayos de toxicidad que determinan el impacto ambiental, estos bioensayos pueden evaluar la mortalidad, inmovilidad o inhibición del crecimiento, entre otros; utilizando para ello bioindicadores como instrumentos biológicos (modelos) para medir dichos parámetros.

Uno de los organismos utilizados como bioindicador es la *Artemia franciscana*, un microcrustáceo de ambiente acuático de alta salinidad, siendo un elemento fundamental del zooplancton, principalmente en ambientes de estuario, lo que lleva a que sea un importante factor dentro de la cadena trófica de tal manera que la reducción de su población hará peligrar la supervivencia de otras especies superiores, por lo cual es utilizada para estudios de toxicidad por su fácil manipulación y costo económico. Considerando estas características se trata de un bioindicador de alta calidad. Por lo cual vamos a empezar por ver algunos antecedentes sobre contaminación y toxicidad.

2. Antecedentes.

A lo largo de la historia, las actividades antropogénicas han generado una gran variedad de contaminantes, los cuales han ocasionado el deterioro de los distintos compartimentos ambientales, incluyendo el agua, el aire, el suelo y el sedimento, así como de la biota asociada y por ende de los ecosistemas. Estos efectos dependen de la concentración en la que se encuentren las sustancias, de su persistencia y de su biodisponibilidad, pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras (Alloway & Ayres, 1997; Bautista, 1999).

Es decir, la contaminación se caracteriza por la introducción o incremento de sustancias que pueden causar daño a la salud humana, perjudicar los recursos vivos y los sistemas ecológicos. A veces, la contaminación es de origen natural, pero en general, está relacionada con la actividad del hombre, que, en su búsqueda de supervivencia y bienestar, dispersa sustancias agresivas, algunas de las cuales pueden ser transformadas por los organismos vivos (biodegradables) y otras que son persistentes (no biodegradables). Dependiendo del medio en que se acumulen los contaminantes, se puede hablar de contaminación en aire, suelo y agua; y en cada caso presenta características propias que requieren medidas de prevención (Alloway & Ayres, 1997; Bautista, 1999).

Durante las décadas de 1940 a 1960, según Macek (1980), los estudios que demostraron los efectos que producían los plaguicidas agrícolas sobre la vida silvestre, catalizaron el desarrollo de la toxicología ambiental y con ella el desarrollo de pruebas en las que, además de la mortalidad, se medían otros indicadores de importancia ecológica, tales como el crecimiento y la reproducción en organismos acuáticos y terrestres. Fue en esta época cuando se reconoció que este tipo de estudios requerían de la participación de investigadores de distintas áreas del conocimiento como son la química, la ecología, la biología y la toxicología, entre otras.

Es decir, la investigación formal de estos efectos adversos de los contaminantes sobre los organismos se inicia en la década de los años 30, a través del desarrollo de estudios para determinar la relación causa-efecto entre la presencia de contaminantes químicos en el agua y sus efectos biológicos en poblaciones de peces. Estos estudios se enfocaron en su mayoría a confirmar si un contaminante, del que se tenía sospecha, era el agente causante de un daño que ya había ocurrido y se basaron en pruebas de mortalidad de los organismos (pruebas de toxicidad aguda).

Entre los primeros animales acuáticos empleados en los estudios de toxicidad se encuentra la carpa dorada (pez ornamental), la cual es una especie de fácil manejo en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, cuando se descubre que estos peces eran más resistentes que otras especies de importancia económica y social como las truchas, se inicia el desarrollo de una plétora de pruebas con una gran variedad de organismos. Con ello se demostró claramente la gran diferencia en la sensibilidad a los contaminantes que existe entre los organismos, la cual puede variar incluso en varios órdenes de magnitud (Macek, 1980).

Al estudiar estos organismos, es decir los sistemas acuáticos (figura 1), se consideró que son receptores de toda clase de desechos urbanos que, en su mayoría, son orgánicos; detectándose, además, la presencia de compuestos tóxicos como el verde de malaquita utilizado como plaguicida (Fargašová, 2001), que generalmente son considerados agresivos por su persistencia en los sedimentos (Visviki & Rachlin, 1991). La contaminación del agua procede de la adición de materia extraña indeseable que deteriora su calidad y se da por la liberación de residuos y contaminantes que drenan a las escorrentías y luego son transportados hacia ríos, penetrando en aguas subterráneas o descargadas en lagos o mares (figura 2). Los principales contaminantes son detergentes, insecticidas, grasas, colorantes, disolventes, metales, plaguicidas, sales inorgánicas, fertilizantes y descargas de residuos sólidos (Solís & López, 2003).

Es indudable el aumento en los niveles de contaminantes (metales y compuestos orgánicos persistentes o COP's) en los sistemas acuáticos, hecho que constituye un

riesgo para actividades como las pesquerías y el cultivo de organismos (acuicultura); implican un peligro a la salud pública de los habitantes de éstas áreas; y una de las principales medidas para la conservación del ecosistema implica evaluar los efectos sobre la biota que los habita y desarrollar normas de gestión adecuadas con base a los niveles guía determinados en campo y laboratorio (Baudouin & Scoppa, 1974).

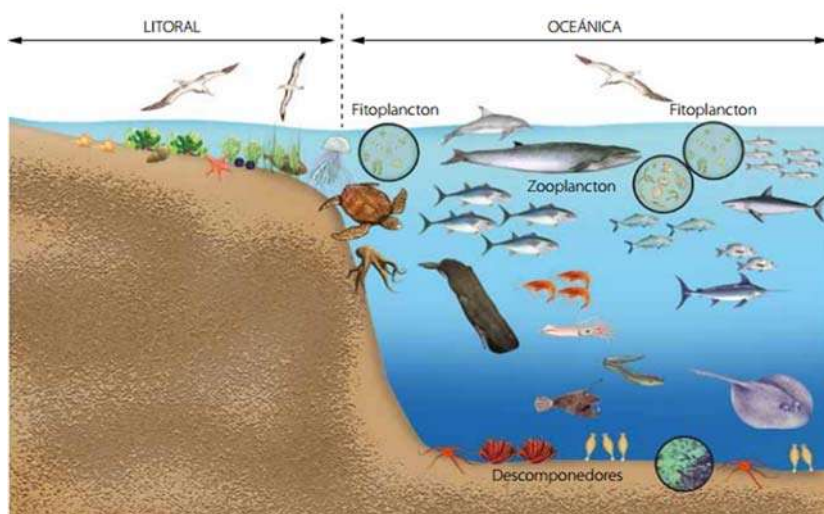


Figura 1. Representación del ecosistema acuático (Castillo, 2011. Ecosistema Acuático. Recuperado de: <http://assets.mheducation.es/bcv/guide/capitulo/8448181697.pdf>).

Para medir esta contaminación y sus consecuencias, nos basamos en las pruebas de toxicidad que aportan una conexión esencial entre la química ambiental (la presencia de sustancias donde no deben estar o en concentraciones mayores a las basales, medidas a través de análisis químicos) y la ecotoxicología (la presencia de sustancias que causan efectos biológicos adversos, medidos en organismos individuales a través de pruebas de toxicidad y en poblaciones a través de análisis de estructura o función de las comunidades) (Rand y Petrocelli, 1985).

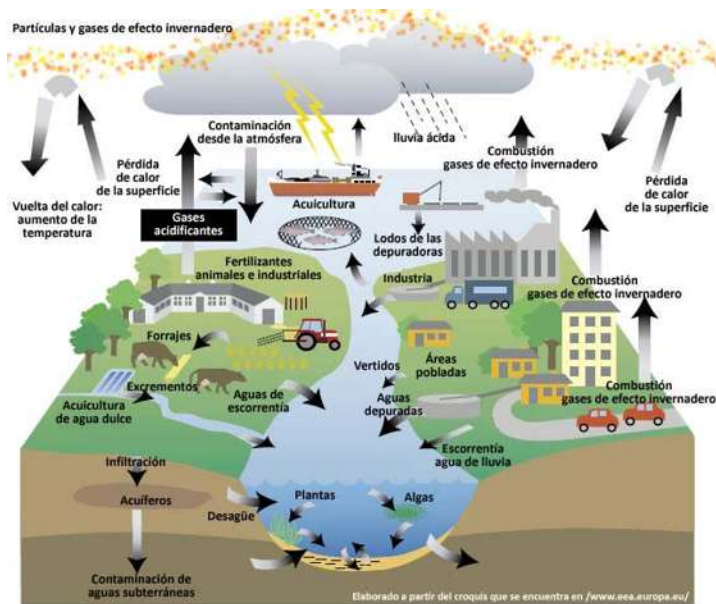


Figura 2. Contaminación del agua (Velilla, 2010. La contaminación de las aguas y el ciclo del agua. Recuperado de: http://geografos.ftp.catedu.es/index.php%3Foption=com_content&view=article&id=454:la-contaminacion-las-aguas-y-el-ciclo-del-agua&catid=102:material-de-aula&Itemid=174.html).

Actualmente, los resultados de las pruebas de laboratorio son aceptados como estimaciones conservadoras de los efectos potenciales de las sustancias en el medio ambiente y se reconoce su utilidad para los programas de monitoreo ambiental, así como para la regulación de sustancias, ya que son herramientas baratas, que permiten identificar y evaluar los efectos potenciales de los contaminantes generados por actividades agrícolas, acuícolas, industriales y urbanas, sobre componentes biológicos, con lo que se puede priorizar muestras o áreas que requieren estudios más exhaustivos y caros. Aún más, integradas con análisis químicos, geológicos y ecológicos, pueden ser utilizadas para determinar índices de calidad ambiental (Rand y Petrocelli, 1985)

Asimismo, las pruebas biológicas pueden ser utilizadas para evaluar la biodisponibilidad de contaminantes, inclusive en muestras con mezclas complejas,

mediante una gran diversidad de respuestas a distintos niveles de organización biológica, que van desde alteraciones bioquímicas y moleculares, hasta disfunción endocrina, modificaciones conductuales y fisiológicas (efectos sobre crecimiento, reproducción) y de los parámetros poblacionales (Rand y Petrocelli, 1985)

Es decir que, desde el punto de vista regulatorio, las pruebas biológicas pueden utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental, para controlar descargas de aguas residuales municipales e industriales, para regular el uso y producción de sustancias químicas y para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental. Por último, las industrias pueden incorporar las pruebas biológicas a su proceso de toma de decisiones con respecto al desarrollo, manufactura y comercialización de sus productos (Rand y Petrocelli, 1985).

Por lo cual las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medio ambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de la sequías y el cambio climático (Barceló, 2016).

En particular para Latinoamérica y en el caso de ambientes de agua dulce, cabe destacar el esfuerzo que el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá realizó en 1996, en el cual expertos de ocho países (Argentina, Canadá, Chile, Colombia, Costa Rica, India, México y Ucrania) llevaron a cabo un programa de intercalibración, con la finalidad de validar una batería de ensayos a través de muestras ciegas y su posterior aplicación en muestras ambientales. Como resultado de esta experiencia se publicó el libro *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (Castillo, 2004). A continuación, nos centraremos en la contaminación por plaguicidas y desinfectantes, siendo estos de principal interés para la investigación.

2.1. Contaminación del agua por plaguicidas y desinfectantes.

Un desafío importante cuando se evalúa la calidad del agua de las corrientes es vincular los datos de contaminantes con los efectos sobre la biota acuática, particularmente para los plaguicidas y desinfectantes, que tienden a ocurrir en arroyos como mezclas complejas con fuertes patrones estacionales y geográficos. El término "plaguicida" es una palabra compuesta que comprende todos los productos químicos utilizados para destruir las plagas o controlarlas; en la agricultura, se utilizan estas sustancias como herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y rodenticidas.

El termino desinfectar es eliminar microbios o gérmenes del ambiente o medio. Esto se puede conseguir mediante el uso de procedimientos físicos, o empleando desinfectantes químicos, como es el uso tan frecuente del cloro. La amplia utilización de plaguicidas y desinfectantes está originando un importante factor de riesgo debido a que periódicamente se viene realizando una prevención sistemática, basada en realizar una correcta desinfección en el entorno de la acuicultura (Nowell, et al, 2014).

Es decir, no es suficiente la prevención, ya que el problema surge cuando una vez realizados dichos tratamientos, estas sustancias no son desechadas de manera correcta y pasan al agua, hasta llegar a zonas fluviales, donde debido a sus características tóxicas y peligrosas para el medio ambiente, comienzan a ejercer sus efectos tóxicos sobre las poblaciones de organismos que allí viven, llegando finalmente a afectar también estuarios y ambientes salinos (Bartolomé-Camacho, 2007).

En los datos recopilados durante 1992-2001 por el Programa Nacional de Evaluación de la Calidad del Agua (NAWQA) del Servicio Geológico de los EE. UU. (USGS), las corrientes estadounidenses con tierras agrícolas y / o urbanas dentro de sus cuencas en el 90% del tiempo en que se analizaron tenían detecciones de 2 o más plaguicidas o degradantes en el agua, 5 o más plaguicidas aproximadamente en el 70% del tiempo en el que fueron analizadas, y 10 o más plaguicidas aproximadamente el 20% del tiempo de su análisis (Nowell, et al, 2014).

A lo anterior agregamos que la acuacultura se ha expandido considerablemente durante las últimas décadas como consecuencia del aumento de la demanda por parte la población mundial ya que las pesquerías posiblemente hayan alcanzado su nivel máximo de producción debido a la sobreexplotación (Castillo, 2004).

Debemos de mencionar que aunque las aguas naturales transportan una cierta cantidad de sales minerales disueltas y de compuestos orgánicos naturales lixiviados del suelo y las rocas, es la contaminación la que tiene como resultado una adición a esta carga natural de productos químicos, que pueden estar destinados a fines industriales, agrícolas (regadío) o urbanos. Estas adiciones potenciales directas o indirectas, son las siguientes: insecticidas, herbicidas (verde de malaquita), fungicidas (sulfato de cobre), bactericidas (hipoclorito sódico), nematocidas, hormonas vegetales, detergentes, metales pesados, sales y numerosos compuestos orgánicos (Law y Skogerboe, 1972). La presencia de contaminantes en cantidad suficiente hace que el agua no sea apta para el riego, el consumo humano o la producción piscícola.

Dentro de estos contaminantes son los compuestos organoclorados (OC), incluidos los plaguicidas, metabolitos y otros contaminantes tales como policlorinados bifenilos (PCB), los más peligrosos contaminantes debido a su alta liposolubilidad y tendencia a bioacumularse a lo largo de la cadena trófica. Como consecuencia, están diseminados en el compartimento biótico del medio ambiente. Por lo tanto, los OC pueden llegar a los consumidores a través de la cadena alimentaria que comprende la alimentación a través de la ingesta de peces. Es decir, se requieren metodologías analíticas sensibles, rápidas y precisas para estudiar los niveles de estos compuestos en productos acuícolas (Serrano, et al, 2003)

Dentro de estas metodologías, la forma más común de evaluar directamente los efectos potenciales de los plaguicidas y desinfectantes es a través del uso de pruebas estandarizadas de toxicidad en el laboratorio que exponen a una sola especie a un solo plaguicida y/o desinfectante sobre un rango de concentraciones durante un período de tiempo específico. La comparación de dichos resultados de toxicidad entre plaguicidas (o un plaguicida entre organismos de prueba) indica la toxicidad relativa

de estos plaguicidas (o la toxicidad relativa de ese plaguicida para estos organismos de prueba) en condiciones de prueba estandarizadas, pero no aborda muchos factores que son importantes para extrapolar a las condiciones de campo. Tales factores deben incluir la relación dosis-respuesta; modo (s) de acción; puntos finales seleccionados; factores ambientales (como carbono orgánico, pH y temperatura); y potencial para efectos aditivos o interactivos de mezclas contaminantes (Nowell et al, 2014).

En las pruebas estandarizadas los procedimientos desarrollados en estudios previos para predecir o evaluar los efectos de las mezclas de plaguicidas usando datos estandarizados de pruebas de toxicidad para una sola especie comúnmente comparten dos pasos: (1) las concentraciones ambientales de plaguicidas individuales se dividen por medidas específicas de toxicidad o efecto, y luego (2) se aplica un modelo para combinar las contribuciones de plaguicidas individuales en la mezcla (Nowell et al., 2014).

2.1.1. Compatibilidad de las mezclas de plaguicidas y desinfectantes.

Como se mencionó en el apartado anterior es importante aplicar un modelo para combinar las contribuciones de plaguicidas individuales en la mezcla (Nowell et al., 2014), ya que en la acuicultura se utilizan diferentes tipos de xenobióticos por su acción plaguicida o desinfectante, en ocasiones muchos de estos utilizados al mismo tiempo o se pueden encontrar en el medio acuático debido al mala disposición de este tipo de sustancias terminando en las zonas fluviales. Los dos mecanismos más importantes por los cuales este tipo de sustancias pueden llegar a ser dañinos son la bioconcentración y la bioampliación (Serrano, et al, 2003).

Bioconcentración: Se trata del movimiento de un producto químico desde el medio circundante hasta el interior de un organismo. El principal "sumidero" de algunos plaguicidas es el tejido graso ("lípidos"). Algunos plaguicidas, como el DDT, son "lipofílicos", lo que quiere decir que son solubles y se acumulan en el tejido graso,

como el tejido comestible de los peces y el tejido graso humano. Otros plaguicidas, como el glifosato, se metabolizan y eliminan a través de las excreciones.

Bioampliación: Con este término se designa la concentración creciente de un producto químico a medida que la energía alimentaria se transforma dentro de la cadena trófica. En la medida en que los organismos pequeños son devorados por los mayores, la concentración de plaguicidas y otros productos químicos se amplía de forma considerable en el tejido y en otros órganos. Pueden observarse concentraciones muy elevadas en los depredadores que se encuentran en el ápice de esa cadena, incluido el ser humano (Andreoli, 1993).

Los efectos ecológicos de los plaguicidas (y otros contaminantes orgánicos) son muy variados y están con frecuencia interrelacionados. Se considera que los efectos producidos en los organismos y en el medio ambiente constituyen una advertencia de las posibles repercusiones en la salud humana. Los principales tipos de efectos son los que se enumeran a continuación y varían según el organismo sometido a investigación y el tipo de plaguicida. Los distintos plaguicidas provocan efectos muy diferentes en la vida acuática, por lo que es difícil formular afirmaciones de alcance general. Lo importante es que muchos de estos efectos son crónicos (no letales), pasan con frecuencia desapercibidos al observador superficial, y sin embargo, tienen consecuencia en toda la cadena trófica (Andreoli, 1993). Esos efectos son los siguientes:

- Muerte del organismo.
- Cáncer, tumores y lesiones en peces y animales.
- Inhibición o fracaso reproductivo
- Supresión del sistema inmunitario.
- Perturbación del sistema endocrino (hormonal).
- Daños celulares y en el ADN.
- Efectos teratogénicos (deformidades físicas, como las que se observan en el pico de algunas aves).

- Problemas de salud en los peces revelados por el bajo coeficiente entre células rojas y blancas, el exceso de mucílago en las escamas y agallas de los peces, etc.
- Efectos intergeneracionales (que sólo se observarán en las generaciones futuras del organismo).
- Otros efectos fisiológicos, como disminución del grosor de la cascara de los huevos.

Estos efectos no son causados necesariamente ni de forma exclusiva por la exposición a los plaguicidas u otros contaminantes orgánicos, pero pueden estar asociados a una combinación de presiones ambientales, como la eutrofización, y agentes patógenos (Andreoli, 1993).

Estas presiones asociadas no tienen que ser necesariamente muy fuertes para provocar un efecto sinérgico con los microcontaminantes orgánicos. Por lo cual es importante pensar en lo que podría pasar por la mezcla de estos compuestos en el organismo a lo largo de la cadena trófica que como consecuencia, están diseminados en el compartimento biótico del medio ambiente, que aunque se regule cantidad permitida para utilizar de estos compuestos, incluso que se regule la práctica de mezclar dos o más herbicidas y desinfectantes en el caldo de pulverización (mezcla utilizada en acuicultura) que es una práctica frecuente y tiene muchas ventajas cuando se compara con el modo de uso de cada producto por separado; generando un aumento del espectro de acción en la aplicación y, en consecuencia, una mayor eficiencia y economía en el control de las plagas, mediante la reducción del número de aplicaciones (Andreoli, 1993), esta mezcla en el tanque puede causar algunos efectos inesperados y contraproducentes con el objetivo biológico (sinergismo, adición o antagonismo en la mezcla), debido a incompatibilidades físicas y/o químicas entre los productos presentes en el mismo caldo. Esto lleva a la pérdida de la actividad y la reducción de la eficiencia de aplicación (Petter et al., 2012).

Una vez revisados los antecedentes de la contaminación, uso de plaguicidas y desinfectantes, a continuación en el presente documento se analizarán los

compuestos químicos (xenobióticos) como el sulfato de cobre, el verde de malaquita y el hipoclorito sódico, debido a su frecuente uso como plaguicidas y desinfectantes en la acuicultura utilizándolos como un medio de información toxicológica dentro de la cadena trófica por el consumo de productos provenientes del ambiente acuático.

Empezaremos por el primero de ellos: el sulfato de cobre

2.1.2. Sulfato de cobre.

Este primer plaguicida. Se nombra de acuerdo la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como tetraoxosulfato (VI) de cobre (II) o conocido comercialmente como sulfato de cobre, otros nombres incluyen sulfato cúprico, vitriolo azul (pentahidratado), bluestone (pentahidratado), bonattite (mineral trihidrato) y calcantita (mineral pentahidratado). Su estructura química es:

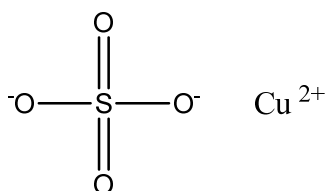


Figura 3. Estructura del sulfato de cobre.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del sulfato de cobre,

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	
Fórmula	CuSO ₄
Estado físico	Polvo blanco grisáceo
Peso molecular	159.6 g/mol

Densidad	3603 kg/m ³ ; 3,603 g/cm ³
Punto de fusión	383 K (110 °C)
Solubilidad en agua	20.3 g/100 mL (20 °C)

El sulfato de cobre (CuSO₄) ha estado en uso desde 1838 para la conservación de la madera y que hoy es la base para muchos conservantes de la madera (Schultz, et al., 2007). Es un compuesto de cobre de gran importancia industrial empleándose como un alguicida en la depuración del agua aprobado por la EPA (U.S.- Environmental Protection Agency). El (CuSO₄) es utilizado para el control de algas, siendo parte integrante de productos comerciales de uso generalizado en acuicultura, tanto para el control de la vegetación acuática indeseable como en la inducción de la muda en los camarones y langostinos adultos (Scelzo, 1997). Así como para disminuir la proliferación de fitoplancton en aguas eutróficas (Mazon, et al., 2002).

Como agente terapéutico, es usado masivamente como agente antiparasitario en la acuicultura, aunque no está aprobado por la FDA, no obstante, en los sistemas de producción extensiva, como estanques, dicha efectividad terapéutica se reduce a medida que la alcalinidad y la dureza total se incrementan (Scelzo, 1997).

El primer uso registrado del cobre como fungicida fue en 1761, pero fue hasta década de 1880 cuando el científico francés Pierre Marie Alexis Millardet descubrió las propiedades fungicidas de amplio espectro de cobre por el uso de sulfato de cobre en forma de caldo bordelés (sulfato de cobre, cal hidratada y agua) y por otra parte una mezcla de sulfato de cobre y carbonato de sodio (llamada "mezcla de Borgoña") estas mezclas se convirtieron en el fungicida de elección en Estados Unidos y Francia, respectivamente, para pulverizar las uvas y en viñedos para combatir el moho (US EPA, 2009; Borkow & Gabbay, 2009).

Además las propiedades fungicidas del cobre fueron demostradas en estudios controlados de laboratorio a principios de la década de 1950 y desde entonces el cobre y compuestos de cobre han demostrado ser eficaces para matar a una amplia gama de levaduras y hongos como *Aspergillus carbonarius* (Bellí, et al., 2006), *Aspergillus niger* (Mumcuoglu, et al., 2008), *Candida albicans* (Zatcoff, et al., 2008), *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* (Kumbhar, et al., 1991).

Así, los fungicidas de cobre se han vuelto indispensables y miles de toneladas se utilizan anualmente en todo el mundo en la agricultura (Weber & Rutala, 2001; La Torre, et al., 2007). Por ejemplo, el sulfato de cobre e hidróxido de cobre son empleadas para el control del mildiu (enfermedades micóticas de las hojas) en las uvas y el cieno verde en los estanques de granja, campos de arroz, canales de riego y drenaje, ríos, lagos, lagunas y piscinas (La Torre, et al., 2007).

También el efecto bacteriostático de cobre se observó por el Dr. Phyllis J. Kuhn, y tras estudios de laboratorio le dan el reconocimiento al comprobar que tiene potentes propiedades antibacterianas (Borkow & Gabbay, 2005). Algunos ejemplos incluyen la muerte por medio de cobre o de compuestos de cobre de *Bacillus subtilis*; *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter*; *Clostridium difficile*; los enterococos; *Escherichia coli*; *Legionella pneumophila*; *Listeria monocytogenes*; *Klebsiella pneumoniae*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella sp.*; *Staphylococcus aureus* (Faúndez, et al., 2004; Cortes, et al., 2006; Gant, et al., 2007).

Estudios recientes han demostrado que los compuestos de cobre no solubles, como el vidrio recubierto con finas películas de CuO (Ditta, et al., 2008), fosfatos degradables de fibras de vidrio impregnadas con CuO (Mulligan, et al., 2003) o metálicos y aleaciones de cobre (Faúndez, et al., 2004) tienen potentes propiedades biocidas, incluso contra las esporas bacterianas (Weaver, et al., 2008). Es importante destacar que a partir de la gran cantidad de ensayos de eficacia antimicrobiana patrocinado por la Asociación de Desarrollo del Cobre (CDA), la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) recientemente en el 2008, aprobó el registro de aleaciones de

cobre como materiales con propiedades antimicrobianas (Copper Development Association, 2008).

Los productos de cobre son uno de los pocos herbicidas registrados para el control de malezas acuáticas que incluyen: instalaciones de acuicultura, sistemas de drenaje (canal, zanja y lateral), estanques (agrícola, industrial y de recreación), lagos, embalses (cultivos y no de cultivos de riego, potable), lagunas de aguas residuales, la media (tanque, canal de agua y estanques) y canales de riego (US EPA, 2009).

Por último, podemos hablar sobre varios compuestos de cobre, como sulfato de cobre, nitrato de cobre y cloruro cúprico-bis-n-dodecilamina, que son potentes molusquicidas. Por ejemplo, se ha demostrado que los siguientes caracoles son atacados por estos compuestos: *Biomphalaria glabrata* (De Oliveira-Filho, et al., 2004); *Biomphalaria alexandrina* (Zidan, et al., 2004) y *Lymnaea natalensis* (Ragad & Shoukry, 2006). El control de caracoles puede ser una estrategia importante en la lucha contra algunas enfermedades humanas, como la esquistosomiasis (Borkow & Gabbay, 2009).

2.1.2.1. Mecanismo de acción tóxica.

Como fungicida y alguicida, el ion cúprico se une a varios grupos, incluyendo grupos sulfuro, imidazoles, carboxilo, fosfato y grupos tiol, grupos que dan lugar a la desnaturalización no específica de proteínas, que conducen a fugas celulares. En moluscos, el cobre altera enzimas peroxidasas y afecta el funcionamiento del epitelio de la superficie (US EPA, 2009).

Aunque el cobre es un metal bio-esencial para el funcionamiento normal de las células y juega un papel crucial como cofactor catalítico en los mamíferos en el sitio activo de proteínas, como citocromo c oxidasa, tirosina, lisiloxidasa, *p*-hidroxifenil piruvato hidrolasa, dopamina beta hidroxilasa y Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD); también es conocido por ser un metal severamente citotóxico, asociado

típicamente con el estrés oxidativo y daño celular si se acumula más allá de la capacidad quelante de la célula (Gaetke, 2003).

Es importante tener en cuenta que el ion Cu^{+2} es el componente con más implicaciones toxicológicas del sulfato de cobre, siendo su comportamiento altamente reactivo, especialmente en ambientes acuáticos (US EPA, 2009).

El principal mecanismo de la toxicidad del cobre implica la formación de radicales libres hidroxilo altamente reactivos a través de la reacción de Fenton y reacciones de Haber-Weiss catalizadas por el metal Cu (Chairi et al., 2010; Main, et al., 2010; Mai, et al., 2012), lo que provoca el daño oxidativo del ADN y la escisión de la doble hélice del DNA (Galaris & Evangelou, 2002; Lesser, 2006).

Los iones de Cu tanto cúprico (Cu^{+2}) y cuproso (Cu^{+1}) pueden participar en reacciones de oxidación y reducción que impulsa la conversión de peróxido de hidrógeno al hidróxido y radical hidroxilo (Figura 4) en la reacción Haber-Weiss (Bremner, 1998):

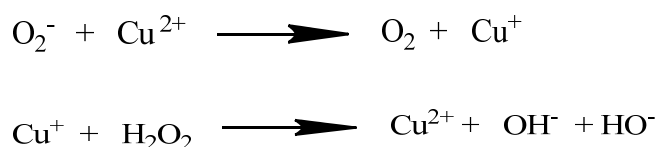


Figura 4. Reacción de Fenton respecto al ion cobre.

El cobre también puede reaccionar con el anión superóxido para producir radicales de oxígeno (Craig, et al., 2007). En los momentos de mayor estrés abiótico, los mecanismos de transporte de electrones (es decir, fotosistemas y cadenas de transporte mitocondrial) se vuelven menos eficientes lo que puede llegar a inhibir la fotosíntesis. A su vez, los electrones libres son más propensos a interactuar con el oxígeno molecular diatómico en última instancia resulta en una serie de especies reactivas de oxígeno (ROS) reducidos (Main, et al., 2010). Así como un aumento de

los niveles de ROS, que a su vez causa la peroxidación lipídica de la membrana y su ruptura (Luza & Speisky, 1996; Devi & Prasad, 2005).

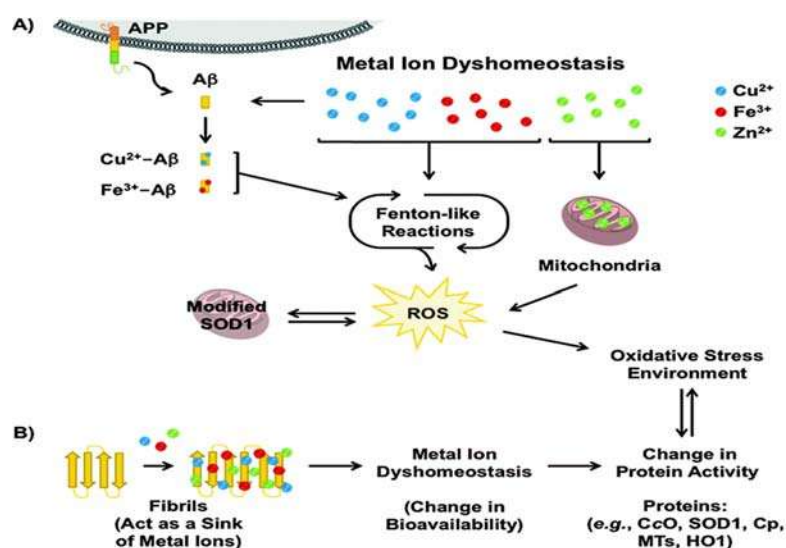


Figura 5. Posibles interacciones de iones metálicos en la inducción de estrés oxidativo e influencia en la actividad de la proteína. (A) Redox activo de iones metálicos (por ejemplo, Cu²⁺ (esferas azules), Fe³⁺ (esferas rojas)) y complejos como Aβ podrían producir especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de reacciones de Fenton similares. Además, la modificación de SOD1 por ROS u otros factores resulta en la acumulación de ROS. El desequilibrio entre la formación y la eliminación de las ROS puede causar estrés oxidativo. (B) El conjunto Aβ puede actuar como un sumidero de iones metálicos, lo que contribuye a la biodisponibilidad alterada de iones metálicos. Desequilibrio de la homeostasis de iones metálicos y / o estrés oxidativo podría interferir con funciones biológicas críticas (por ejemplo, la producción de ATP, la interrupción de ROS, el mantenimiento de la homeostasis de iones metálicos) de proteínas, como la citocromo c oxidasa (CcO), Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), ceruloplasmina (Cp), metalotioneínas (MTs) y hemo oxigenasa 1 (HO1) (Lee, et al., 2014).

Puesto que las branquias están en contacto directo con el medio externo, cambios químicos y físicos en el ambiente acuático las convierte en el principal órgano blanco de la mayoría de los contaminantes acuáticos (Mallatt, 1985). La razón principal de la toxicidad de cobre para los peces e invertebrados acuáticos es la rápida unión del cobre a las membranas branquiales, en general los efectos tóxicos agudos provocan alteraciones de tipo respiratorios y osmoregulatorios, mientras que bajo exposiciones crónicas, se observan alteraciones en el sistema neurológico y endocrino, así como cambios celulares, bioquímicos y fisiológico (Handy, 2003).

La cantidad de ion cúprico en el medio ambiente, y su toxicidad para los animales acuáticos debido a los daños en branquias, dependen de un número de parámetros de calidad del agua incluyendo pH, alcalinidad, y el carbono orgánico disuelto (Husak, 2015). Sin embargo, el sulfato de cobre podría tener efectos colaterales en los peces mediante la inducción de roturas de hebras de ADN, y genotoxicidad en un tejido y especie de manera específica (Gabbianelli, et al., 2003; (Cavas, et al., 2005); Oliveira, et al., 2008). Estudios han demostrado que el sulfato de cobre puede causar daño celular hepático significativo.

Otro de los plaguicidas a estudiar es el:

2.1.3. Verde de malaquita.

El verde de malaquita, es un colorante de triarilmetano (Figura 6), sólido verde oscuro y cristalino preparado por condensación de una parte de benzaldehído con dos partes de diemetilanilina en presencia de ácido sulfúrico concentrado o cloruro de zinc.

El verde de malaquita está disponible en varias formas, principalmente como sal de oxalato o clorhidrato en una solución mínima del 50% como una mezcla de sales de acetato e hidrocloreuro. El hidrocloreuro de verde de malaquita es una variedad de grado industrial que, durante su fabricación, se precipita mediante la adición de cloruro de zinc y, por lo tanto, se obtiene como una sal doble de zinc (Srivastava, et al., 2004)

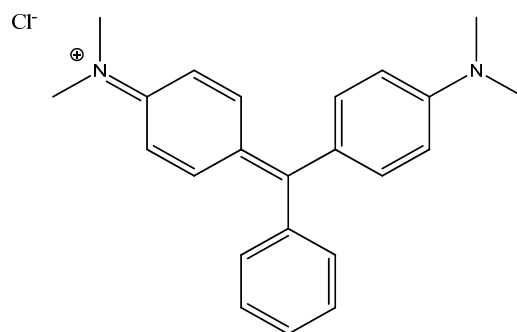


Figura 6. Estructura del verde de malaquita.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del verde de malaquita.

	
Nombre IUPAC	
Cloruro de 4-{[4-(dimetilamino)fenil](fenil)metiliden}-N,N-dimetilciclohexa-2,5-dien-1-iminio	
General	
Otros nombres	verde de anilina, verde básico 4, verde de diamante B, verde de victoria B
Propiedades físicas	

Apariencia	verde
Punto de ebullición	432,15 K (159 °C)
Densidad	1.9g/cm ³ (25°C)
Peso molecular	927.02 g/mol
pH	3.8(10g/l, H ₂ O, 20°C)
Solubilidad en agua	1.5 g/l (20°C)

Este colorante, al igual que otros trifenilmetanos, pueden existir en dos formas iónicas: como colorante en forma de sal y como carbinol o pseudobase (figura 7). De acuerdo con Albert (1979), es probablemente que con la forma de pseudobase estos iones entran a las células debido a su solubilidad en lípidos es mucho mayor. La constante de ionización (pK) del MG (por sus siglas en ingles malachite Green) es de 6.90. Está 100% ionizado a pH 4.0, al 50% a pH 6.9, al 25% a 7.4 y al 0% a pH 10.1 (Goldacre & Phillips, 1949).

En los animales, la MG se reduce a través de la biotransformación a su forma incolora, verde leucomalaquita y persiste en los tejidos (Werth y Boiteaux, 1967; Poe & Wilson, 1983; Michaels & Lewis, 1986; Ollikka et al., 1993; Azmi et al. 1998; Pointing & Vrijmoed, 2000). Verde de leucomalaquita es estructuralmente similar a las aminas aromáticas clásicas y es un precursor del tinte durante su producción y podría estar presente como un contaminante en el colorante preparado comercialmente.

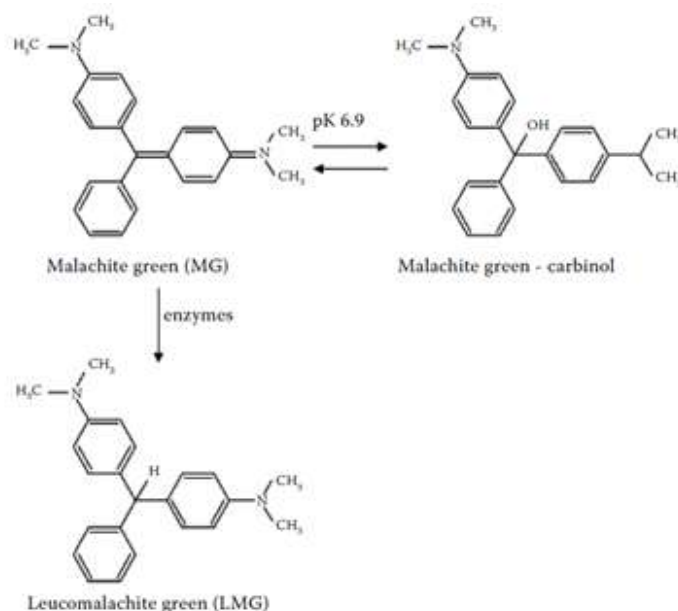


Figura 7. Formula estructural del verde de malaquita, su forma de carbinol y su metabolito verde de lecomalaquita (Albert, 1979).

Sobre sus características como fungicida, Bumpus y Brock (1988) informaron por primera vez el metabolismo fúngico del MG, Henderson y cols. demostraron su reducción por microflora intestinal. (1997). Recientemente, se informa que el MG se reduce y se metaboliza por hongos filamentosos, *Cunninghamella elegans* (Chang-Jun et al., 2001).

MG se ha utilizado ampliamente como fungicida tópico (Hussein et al., 1999; Qureshi et al., 1998) y ectoparasitocida en la piscicultura en todo el mundo desde 1936 (Foster y Woodbury, 1936). En la acuicultura africana, se ha utilizado contra la infección por bacterias, protozoos, cestodos, trematodos, nematodos, crustáceos, etc. (Hecht y Endemann, 1998).

De igual manera el MG se ha usado en gran medida para evitar la proliferación de hongos oomicetos en peces y huevos de peces, como terapia postinfecciosa y profilaxis (Alderman, 1985, 2002, Gerundo et al., 1991). Se encontró que era el fungicida más efectivo entre 49 compuestos probados contra un hongo oomycete

(Campbell et al., 2001). Ha impedido el crecimiento de *Haliphthoros* en langosta de roca (Diggles, 2001).

La saprolegniasis también ha sido efectivamente controlada por MG en salmones (Willoughby y Roberts, 1992), bagre de canal (Bly et al., 1996) y trucha arcoiris (Valia y Fabian, 1998). La infección por *Aphanomyces invadis* (Lilley e Inglis, 1997) y *Aspergillus flavus* (Bhattacharya, 1995) en *Channa* y algunos otros peces también se trataron de forma efectiva con MG. Los huevos de *Cyprinus carpio* y *tench* han sido tratados profilácticamente para prevenir la infección por hongos (Jaehnichen, 1976; Kouril et al., 1998): también se ha usado con eficacia para controlar protozoos (Rintamaki-Kinnunen y Valtonen, 1997).

2.1.3.1. Mecanismo de acción tóxica.

El verde de malaquita es ambientalmente persistente y extremadamente tóxico para una gran variedad de animales acuáticos y terrestres. Causa serios peligros para la salud pública y también plantea un posible problema ambiental. Las observaciones clínicas y experimentales reportadas hasta el momento revelan que el verde de malaquita puede ser tóxico en múltiples órganos.

El colorante verde de malaquita es usado globalmente como un antifúngico y un antiparasitario en crustáceos y peces de importancia en acuicultura (Rintamaki et al., 2005; Zilberg & Tamar, 2006). Se le ha empleado para el control del protozoo *Ichthyophthirius multifiliis* Bouquet 1876 (Ichthyoptariasis), y del monogeneo *Dactylogyrus vastator* Nybelin 1924 (Schmahl et al., 1992; Molnar, 1995; Rintamaki et al., 2005).

Su uso no está permitido en los Estados Unidos, la Unión Europea y en algunos países del sudeste asiático como Tailandia, debido a que se considera que tiene un rol altamente tóxico sobre las enzimas respiratorias. En adición, es esencial tener periodos largos de carencia después de la aplicación del verde de malaquita debido a los residuos persistentes en los alimentos de origen acuático (GESAMP, 1997; Grant

et al., 2001; Andersen et al., 2006). También el verde de malaquita es empleado en salud, en la industria de alimentos y textil; así como para el control de helmintiasis en peces y otros organismos acuáticos (Van de Riet et al., 2005; Hernando et al., 2007).

Se le ha reportado que causa variación de los parámetros hematológicos, carcinogénesis, mutagénesis, fracturas cromosómicas, teratogenicidad y toxicidad respiratoria (Silveira et al., 2004; Srivastava et al., 2004). También se han informado que, en la glándula tiroides, la verde leucomalaquita resulta en el bloqueo de la síntesis hormonal, disminuye la T4 y aumenta las concentraciones de TSH y causa tumores en las células del folículo tiroideo de las ratas (Doerge et al., 1998).

Con base a los resultados en conejos, el verde de malaquita es clasificado entre sustancias con efectos teratogénicos (Meyer y Jorgenson, 1983). También se ha demostrado que MG puede inhibir la oxidación mitocondrial y la glutatión-S-transferasa (Glanville y Clark, 1997), y que en su forma de verde de lecomalaquita (LMG por sus siglas en inglés leucomalachite Green) puede inhibir la peroxidasa tiroidea, cuya actividad determina la síntesis de la hormona tiroidea (Doerge et al., 1998). Además de exhibir una acción altamente citotóxica en todas las células de mamíferos, el verde de malaquita también induce la peroxidación de lípidos y la formación de radicales libres peligrosos (Srivastava et al., 2004), mediante alteración de la situación redox de las células tumorales, generando cantidades importantes de radicales libre (también llamadas especies oxigenadas reactivas, ROS), la generación de ROS intracelular induce una pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, que experimenta una pérdida de su integridad, facilitando la salida de moléculas proapoptóticas.

Adicionalmente el inhibe la glutatión-S-peroxidasa, una enzima que destruye los radicales libres de oxígeno, ocasionando un aumento del peróxido de hidrógeno intracelular. A su vez, el peróxido de hidrógeno reduce el potencial de la membrana mitocondrial con salida del citocromo C y activación de las caspasas. El resultado final es la inducción de apoptosis (figura 7)

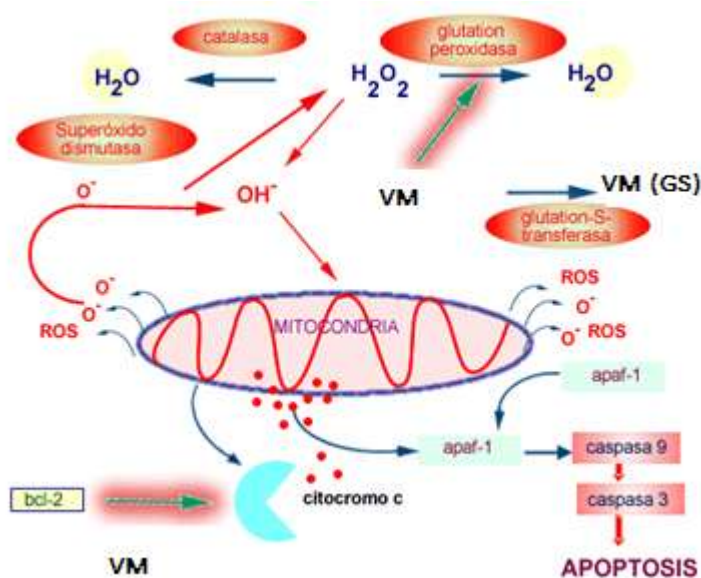


Figura 8. El verde de malaquita afecta la situación redox de las células tumorales, generando cantidades importantes de radicales libre (también llamadas especies oxigenadas reactivas, ROS). (Albert, 2004). Modificada.

La información sobre genotoxicidad, bioacumulación y genotoxicidad reproductiva aún es incompleta, y tampoco se han establecido los límites de ingesta diaria admisible (IDA).

Y por último tenemos al:

2.1.4. Hipoclorito sódico.

El hipoclorito de sodio (cuya disolución en agua es conocida como lejía o cloro) es un compuesto químico, fuertemente oxidante de fórmula NaClO. Contiene cloro en estado de oxidación +1, es un oxidante fuerte y económico. Debido a esta característica se utiliza como desinfectante, además destruye muchos colorantes por lo que se utiliza como blanqueador (US EPA, 1989).

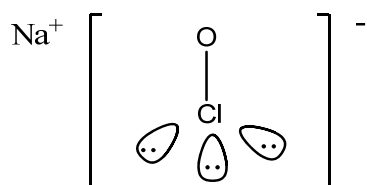


Figura 9. Estructura del hipoclorito sódico.

Tabla 3. Propiedades físicas y químicas del hipoclorito sódico.

Nombre IUPAC	
Hipoclorito	
Propiedades físicas	
Apariencia	Verde (líquido, diluido). Sólido (blanco)
Densidad	1110 kg/m ³ ; 1,11 g/cm ³
Masa molar	74.44 g/mol
Punto de fusión	291 K (18 °C)
Punto de ebullición	374 K (101 °C)
Propiedades químicas	
Acidez	<7 pK _a
Solubilidad en agua	29.3 g/100mL (0 °C)

En disolución acuosa sólo es estable en pH básico. Al acidular en presencia de cloruro libera cloro elemental, que en condiciones normales se combina para formar el gas dicloro, tóxico. Por esto debe almacenarse alejado de cualquier ácido. Tampoco debe mezclarse con amoníaco, ya que puede formar cloramina, un gas muy tóxico.

El hipoclorito de sodio, es una solución que contiene de 12.5% a 25% de gas cloro activo (Cl_2), tiene una amplia gama de productos domésticos e industriales, aplicaciones científicas y biomédicas relacionadas con sus propiedades biocidas (US EPA, 1994, Brondeau et al., 2000). Cuando NaOCl se agrega al agua y aguas residuales, la solución reacciona fácilmente con materiales biológicos (incluyendo proteínas y bases de nucleótidos) para producir una variedad de compuestos orgánicos clorados (US EPA, 1989), que son principalmente lipófilos, persistentes y tóxicos en ambientes acuáticos (Salinoja-Salonen y Jokela, 1991).

El uso médico del cloro comenzó en 1826 con agua combinada con cloro en salas de parto para prevenir la fiebre puerperal, y el cloroformo se utilizó por primera vez para anestesia médica en 1847 (Carey et al., 1998). Hoy en día, el uso biomédico generalizado de NaOCl se refiere particularmente a las desinfecciones locales de la superficie y domésticas, debido a su amplio espectro de actividad biocida contra bacterias, virus y hongos.

2.1.4.1. Mecanismo de acción tóxica.

El uso mundial de hipoclorito de sodio como solución de irrigación del conducto radicular se debe principalmente a su eficacia para la disolución pulpar y la actividad antimicrobiana. Una solución menos concentrada, como el hipoclorito sódico al 1%, presenta una compatibilidad biológica aceptable.

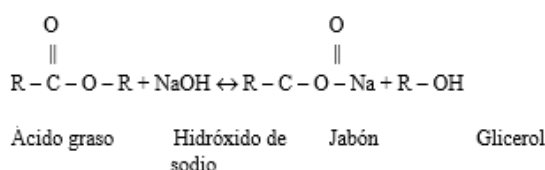
Pécora et al. (1999) informaron que el hipoclorito de sodio exhibe un equilibrio dinámico como lo muestra la reacción:



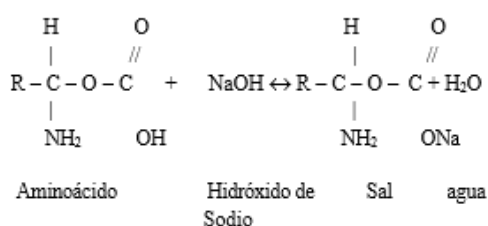
Figura 10. Reacción de equilibrio dinámico del hipoclorito de sodio.

Las reacciones químicas verificadas entre el tejido orgánico y el hipoclorito de sodio se muestran en la figura 11.

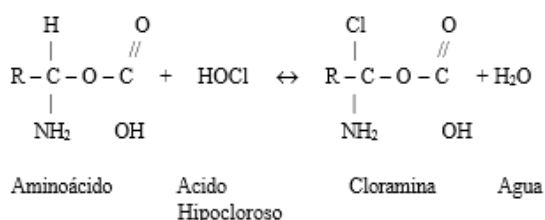
Reacción de saponificación.



Reacción de neutralización de aminoácidos.



Reacción de cloraminación.



Byas Dent J 13(2) 2002

Figura 11. Reacciones del hipoclorito sódico en el tejido orgánico (Estrela et al., 2002).

Al interpretar estas reacciones químicas, se puede observar que el hipoclorito de sodio actúa como un solvente orgánico y graso que degrada los ácidos grasos, transformándolos en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (alcohol), que reduce la tensión superficial de la solución restante (reacción de saponificación).

El hipoclorito de sodio neutraliza los aminoácidos que forman agua y sal (reacción de neutralización). Con la salida de iones hidroxilo, hay una reducción de pH. El ácido hipocloroso, una sustancia presente en la solución de hipoclorito de sodio, cuando está en contacto con el tejido orgánico actúa como disolvente, libera cloro que, combinado con el grupo amino de la proteína, forma cloranos (reacción de cloraminación). El ácido hipocloroso (HOCl) y los iones de hipoclorito (OCl^-) conducen a la degradación e hidrólisis de los aminoácidos.

La reacción de cloraminación entre el cloro y el grupo amino (NH) forma cloraminas que interfieren en el metabolismo celular. El cloro (oxidante fuerte) presenta una acción antimicrobiana que inhibe las enzimas bacterianas y conduce a una oxidación irreversible de los grupos SH (grupo sulfhidrilo) de las enzimas bacterianas esenciales.

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del hipoclorito de sodio cuando está en contacto con el tejido orgánico, estas reacciones pueden verificarse. El hipoclorito de sodio es una base fuerte ($\text{pH} > 11$). Con una concentración del 1%, el hipoclorito de sodio presenta una tensión superficial igual a 75 dinas / cm, pegajosidad igual a 0.986 cP, 65.5 mS de conductividad, 1.04 g / cm³ de densidad y capacidad de humectación igual a 1 h y 27 min. Se puede observar su mecanismo de acción antimicrobiano verificando sus características fisicoquímicas y su reacción con el tejido orgánico.

Teniendo en cuenta el conocimiento de los procesos de pH y actividades aisladas en sitios enzimáticos esenciales, como los que se encuentran en la membrana, resulta esclarecedor asociar hipoclorito de sodio (pH alto, más de 11) a efectos biológicos dañinos sobre las células bacterianas para explicar una parte de su mecanismo de acción (Estrela et al., 2002).

Estrela et al. (2002) estudiaron el efecto biológico del pH sobre la actividad enzimática de bacterias anaeróbicas. Porque los sitios enzimáticos se encuentran en la membrana citoplásmica, que es responsable de funciones esenciales como el metabolismo, la división y el crecimiento celular, y participa en las últimas etapas de la

formación de la pared celular, la biosíntesis de lípidos, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, los autores creen que los iones hidroxilo del hidróxido de calcio desarrollan su mecanismo de acción en la membrana citoplásmica. Las enzimas extracelulares actúan sobre los nutrientes, carbohidratos, proteínas y lípidos que, a través de la hidrólisis, favorecen la digestión. Las enzimas intracelulares ubicadas en la célula favorecen la actividad respiratoria de la estructura de la pared celular. El gradiente de pH de la membrana citoplásmica se ve alterado por la alta concentración de iones hidroxilo del hidróxido de calcio que actúa sobre las proteínas de la membrana (deu- maturación proteica). El pH alto (12.5), influenciado por la liberación de iones hidroxilo, altera la integridad de la membrana citoplásmica por medio de lesiones químicas a componentes orgánicos y transporte de nutrientes, o por medio de la degradación de fosfolípidos o ácidos grasos insaturados del citoplasma membrana, observada en el proceso de peroxidación, que es una reacción de saponificación (Estrela, et al., 1995).

La eficacia antimicrobiana del hipoclorito de sodio está basada en su alto pH (acción de iones hidroxilo), es similar al mecanismo de acción del hidróxido de calcio. El alto pH del hipoclorito de sodio interfiere en la integridad de la membrana citoplásmica con una inhibición enzimática irreversible, alteraciones biosintéticas en el metabolismo celular y la degradación de los fosfolípidos observada en la peroxidación lipídica.

La reacción de cloraminación de aminoácidos (reacción 3) que forma cloraminas interfiere con el metabolismo celular. La oxidación promueve la inhibición enzimática bacteriana irreversible reemplazando el hidrógeno con cloro. Esta inactivación enzimática se puede observar en la reacción del cloro con grupos amino (NH) y una oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilo (SH) de las enzimas bacterianas (cisteína) (Estrela et al., 2002).

Por lo tanto, el hipoclorito de sodio presenta actividad antimicrobiana con acción sobre sitios enzimáticos esenciales bacterianos que promueven la inactivación irreversible originada por los iones hidroxilo y la acción de cloraminación. La disolución del tejido orgánico puede verificarse en la reacción de saponificación cuando el

hipoclorito de sodio degrada los ácidos grasos y los lípidos, lo que produce jabón y glicerol.

Una vez revisadas las características y los mecanismos de acción de los tres compuestos químicos (verde de malaquita, sulfato de cobre e hipoclorito sódico), los cuales nos sirvieron como base para el planteamiento de su estudio toxicológico a continuación pasaremos a describir la metodología que fue realizada mediante la aplicación de bioensayos

2.2. Aplicación de bioensayos.

La aplicación de los bioensayos tiene un papel importante para la ecotoxicología que como ciencia ambiental interdisciplinaria ha evolucionado principalmente desde la toxicología, la ecología aplicada y la química ambiental. Se centra en las interacciones entre los productos químicos ambientales y la biota, abordando así los efectos adversos en los diferentes niveles de la organización biológica. Los efectos tóxicos de los compuestos antropogénicos en la biota y los ecosistemas se consideran en relación con su química y destino en el medio ambiente. La biodisponibilidad de los productos químicos, que depende de los procesos biogeoquímicos y fisiológicos, es un factor importante, a menudo descuidado en la evaluación ecotoxicológica y la evaluación de peligros. La fracción biodisponible es crítica para la absorción y, en última instancia, para la concentración en el sitio objetivo en los organismos (Fent, 1998).

La investigación ecotoxicológica requiere un enfoque interdisciplinario teniendo en cuenta los procesos fisicoquímicos, moleculares, toxicológicos, fisiológicos y ecológicos. Considerando que la ecotoxicología en la práctica se ocupa de cuestiones reglamentarias (registro de productos químicos) y, por lo tanto, de pruebas de productos químicos en pruebas normalizadas; el objetivo de la investigación ecotoxicológica es comprender e investigar los fenómenos toxicológicos en una variedad de biota de diferentes complejidades, poblaciones y el ecosistema como un

todo. De esta manera, se consideran diversos aspectos tales como los mecanismos de acción tóxica y los procesos ecológicos en sistemas contaminados (Fent, 1998).

Los estudios ecotoxicológicos también se centran en los efectos ecológicos y toxicológicos observados en el campo en estudios retrospectivos, por lo que una correlación causal entre los efectos y el análisis de residuos químicos es a menudo difícil de establecer. Las investigaciones ecológicas, como los estudios de biomonitorio, por sí solas no tienen suficiente poder de resolución para identificar los agentes causales. Del mismo modo, el análisis químico de los contaminantes en los ecosistemas por sí solos no puede proporcionar evidencia de las consecuencias toxicológicas en la biota. Se necesita un enfoque integrado que considere los conceptos ambientales, químicos, toxicológicos y ecológicos para comprender los efectos ecotoxicológicos en los ecosistemas contaminados.

Por lo anterior se maneja lo que se conoce como prueba de toxicidad que es un ensayo en el cual un organismo o grupo de organismos (bioindicador) son expuestos a un agente (químico, físico o biológico) para establecer y medir una respuesta previamente seleccionada. En una prueba de toxicidad, usualmente se mide la proporción de organismos afectados por su exposición a concentraciones específicas de dichas sustancias y aguas (SEGOB, 2010). Esta respuesta se valora mediante la cuantificación del cambio en la característica o la ocurrencia de un determinado fenómeno (Barreto & Peralta, 2009).

Los efectos observados pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, y son evaluados a través la reacción de los organismos, como son muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Dichas pruebas sirven como herramientas que, al ser usadas conjuntamente con las mediciones químicas y ecológicas, permiten identificar, cuantificar y generar criterios para el control de la descarga de contaminantes tóxicos (Díaz, et al., 2004a). Una de las aplicaciones más extendidas del monitoreo de efectos biológicos con ensayos de

toxicidad, ha sido la evaluación de descargas líquidas o efluentes (aguas servidas de origen doméstico, municipal o industrial descargadas de manera puntual sobre cuerpos receptores), en el marco de programas de control ambiental (Ronco & Díaz, 2004).

En sentido toxicológico, los bioensayos son pruebas para medir la potencia de una sustancia fisiológicamente activa, generalmente de origen desconocido, diseñados para medir los efectos biológicos de uno o más contaminantes sobre una o más especies de organismos (López, 2009) dependiendo sus características se elegirá con cual trabajar (tabla 4). También se cuenta con grupos control los cuales no se exponen al tóxico. Se debe considerar que el efecto tóxico de una sustancia sobre los sistemas biológicos es el resultado de la acción combinada de todas las sustancias presentes en el medio, incluso aquellas que no son tóxicas por naturaleza, pero que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema y, en consecuencia, las condiciones de vida de los organismos. Por ejemplo, en los sistemas acuáticos existen sustancias que agotan el oxígeno, o que son coloreadas o que impiden la propagación de la luz (caso del material particulado). Además, se debe tener en cuenta aquellos efectos no directamente relacionados con la sustancia tóxica como el daño producido por cambios en la temperatura o por radiación (Díaz, et al., 2004) y que la complejidad y heterogeneidad de los materiales dan lugar a una variedad de problemas experimentales cuando se practican los ensayos. Estos pueden estar relacionados con la inestabilidad de la muestra debido a diferentes reacciones y procesos, como separación de fases, sedimentación, volatilización, hidrólisis, fotodegradación, precipitación, biodegradación, biotransformación e incorporación por los organismos (Ronco, et al., 2004).

Aunque existe un limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, han venido siendo las fuentes de información predominantes para la evaluación de los efectos de los contaminantes tóxicos (Ronco, et al., 2004).

Tabla 4. Criterios para la selección de pruebas biológicas en el laboratorio para la evaluación toxicológica (Ramírez & Mendoza, 2008).

Factibilidad	• Bajo costo • Materiales y reactivos disponibles en la localidad • Tiempo máximo de desarrollo, 5 días. • Procedimiento de prueba simple • Facilidad en la evaluación de la respuesta a medir.
De los organismos	• Fácil obtención • Fácil mantenimiento • Representatividad ecológica: De un grupo funcional, grupo taxonómico (bacterias, peces, insectos, etc.), ruta de exposición (dérmica, ingestión, branquial, combinadas, etc.) • Con información sobre su sensibilidad a compuestos tóxicos (base de datos) • Sensibilidad a bajas concentraciones, a una amplia variedad de compuestos tóxicos • Información sobre su biología. • Respuesta relevante a los compuestos químicos.

De las pruebas	• Condiciones presentes en los ecosistemas mexicanos (temperatura, salinidad, dureza, etc.) • Concentraciones químicas reales en el medio ambiente • Técnicamente seguros y no contaminantes • Posibilidad de ser estandarizada • Buena exactitud y precisión analíticas • Significado ecológico de los resultados • Requerimientos mínimos de sobrevivencia /reproducción en pruebas y testigos • Comprobación de concentraciones nominales • Sensibilidad y replicación (depende del número de réplicas por concentración, nivel de significancia establecido y tipo de análisis estadístico que se lleve a cabo)
------------------------------	---

La normatividad en México (NOM-001-SEMARNAT-1996) para la descarga de aguas residuales en cuerpos de agua incorpora mediciones de parámetros fisicoquímicos como: pH, temperatura, sólidos suspendidos y sedimentables, compuestos de carbono, fósforo, nitrógeno, metales pesados y microorganismos patógenos. La US EPA (US EPA, 1993; 1994) ha desarrollado procedimientos específicos y detallados para limitar las descargas en función de objetivos de calidad aceptables para el cuerpo receptor. Esto basado en ensayos de toxicidad que evalúan efectos letales y subletales de sustancias específicas. Por otra parte, este organismo ha elaborado ecuaciones para la estimación de concentraciones permisibles de sustancias tóxicas. De esta manera se logra implementar el monitoreo del efluente en el sitio de descarga, y proyectar su efecto sobre el cuerpo receptor (Ronco & Díaz, 2004).

El monitoreo de efluentes se ha orientado hacia la evaluación de cumplimiento de las reglamentaciones de descarga, para la predicción del impacto de descargas sobre sitios específicos del cuerpo receptor, para evaluar el efecto combinado de mezclas complejas de compuestos tóxicos y mejoras en procesos tecnológicos de control de la contaminación (Ronco & Díaz, 2004).

Como herramienta importante por parte de los bioensayos para la ecotoxicología analizaremos los tipos de bioensayos que pueden ser utilizados dentro de la normatividad la cual describiremos a continuación:

2.2.1. Tipos de bioensayos.

La NOM-052-SEMARNAT-2005 define la toxicidad como la propiedad de una sustancia o mezcla de sustancias de provocar efectos adversos en la salud o en los ecosistemas; y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de la vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico (Ronco, et al., 2004). El potencial nocivo de una sustancia tóxica puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, etcétera. Por lo que, la toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico (Ronco & Díaz, 2004).

Los bioensayos se clasifican principalmente en: Bioensayos de toxicidad aguda y crónica (Barreto & Peralta, 2009).

Bioensayos de toxicidad aguda

Son aquellos que cuantifican la alteración causada por alguna sustancia tóxica, sobre los organismos de una especie; esta alteración es observada sobre parámetros que alteran funciones vitales de un organismo, ya sea mortalidad, inmovilidad o alteración en la tasa de crecimiento.

Bioensayos de toxicidad crónica

Cuantifican los efectos en el desarrollo, reproducción o viabilidad poblacional de una especie determinada expuesta a un tóxico, por un tiempo no inferior al 20% de su ciclo de vida (Barreto & Peralta, 2009).

Para ensayos agudos uno de los valores más utilizados es la CL_{50} [concentración de un xenobiótico que causa la muerte al 50 % de la población en un tiempo determinado generalmente (48 – 96) horas] (Barreto & Peralta, 2009). Para ensayos crónicos como también para los agudos se pueden estimar la concentración segura o a la cual no se observa efecto en términos biológicos descrito de la siguiente manera:

- La concentración más alta a la cual no se observa efecto (NOEC).
- La concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC).
- La concentración efectiva (CE) correspondiente a una estimación de la concentración del tóxico que puede causar un efecto adverso observable mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos.
- Concentración letal (LC), la cual corresponde a la concentración del tóxico o efluente o muestra que causa la muerte a un determinado porcentaje de la población expuesta.
- Concentración inhibitoria (CI), la cual corresponde a la concentración del tóxico o muestra o efluente que puede producir una reducción de una respuesta biológica en una población expuesta.

Teniendo en cuenta que para esta investigación se utilizaron los bioensayos de toxicidad aguda procederemos a describir a los bioindicadores en general, siendo estos fundamentales para los bioensayos y en un apartado siguiente abordaremos el bioindicador utilizado en esta investigación la *Artemia*.

2.3. Bioindicadores y la *Artemia*.

El uso de bioindicadores en estudios ecológicos para verificar la biodisponibilidad y la presencia de concentraciones relevantes en la biota (Bucheli y Fent, 1996) es una estrategia para evaluar la contaminación y sus efectos potenciales, estos pueden

proporcionar una herramienta integradora para medir estos cambios, ya que "transmiten un mensaje complejo en unos simplificados y de manera útil proporciona información acerca de una tendencia o evento que no puede ser observado directamente" (Linton & Warner, 2003), cuantificando así la magnitud del estrés, las características del hábitat y el grado de exposición del estresor o el grado de respuesta ecológica a la exposición. Por lo tanto, un bioindicador es, un organismo selecto por el grado de sensibilidad o tolerancia a diversos tipos de contaminación o sus efectos (De la Lanza- Espino, 2000).

Las características de un buen bioindicador, se basan en tener una vida corta para integrar la variabilidad ambiental a corto plazo, ser abundante y presentar una facilidad de operación, ser sensibles para reflejar las condiciones en un sitio, y presentar una respuesta específica para identificar un especial impacto en el ecosistema, y se debe conocer su ciclo reproductivo y su distribución (De la Lanza- Espino, 2000; Desrosiers, et al., 2013). En México no fue sino hasta la década de los sesentas que dichos organismos biológicos fueron utilizados como bioindicadores; especialmente los insectos acuáticos.

Cairns & Dickson (1971) señalan los siguientes beneficios de los bioindicadores:

1. Los datos biológicos son fácilmente accesibles como los químicos y físicos.
2. La información puede expresarse numéricamente.
3. Existen conceptos biológicos que, propiamente aplicados, proveen información mejor que otros descritos para ciertos tipos de contaminación.
4. La colección y evaluación de información biológica puede realizarse por grupos industriales u otros ajenos a la biología.

Entre los grupos de organismo que pueden ser empleados como indicadores biológicos para la calidad del agua se encuentran bacterias, protozoarios, algas (fitoplancton), macroinvertebrados (insectos, moluscos, anélidos, poliquetos, crustáceos, nemátodos), macrofitas y peces (Chapman, 1994).

Entre los integrantes de los ecosistemas acuáticos, el zooplancton constituye una comunidad clave. Sus componentes poseen un rol central en las tramas tróficas, y su elevada sensibilidad a los cambios físicos y químicos del medio los tornan adecuados para su utilización como bioindicadores de contaminación por metales. Si bien pertenecen a diversos grupos funcionales, en conjunto contribuyen al transporte de materia y energía desde los niveles tróficos inferiores hacia los superiores. Intervienen activamente en el reciclado de materia orgánica disuelta, se alimentan de algas, detritos u otros microorganismos y son el principal recurso de numerosos peces e invertebrados acuáticos (figura 12) (Ortiz, et al., 2006).

Los anostracos pertenecen al grupo de los microcrustáceos del zooplancton y dada su gran sensibilidad, son utilizados en estudios ecotoxicológicos si se compara con otros miembros de dicha comunidad. En este sentido, permiten evaluar no sólo los efectos directos, sino también el impacto indirecto de los contaminantes o estresores ambientales, otorgando mayor representatividad a los resultados obtenidos y estimaciones a largo plazo (Boyd, 2010). Esto se debe a que dicho análisis requiere frecuentemente observaciones a mayor escala, o bien sobre las interacciones con los niveles tróficos adyacentes, lo cual resultaría dificultoso con organismos de mayor talla o tiempo generacional.

En este trabajo de investigación se mostrará como bioindicador al anostraco *Artemia*, alimento vivo acuático más utilizado en el mundo, tanto por las cantidades consumidas como por el número de especies a las que sirve de alimento (Sorgeloos, 1986). *Artemia* pertenece al primer eslabón de la cadena trófica, la facilidad y rapidez con que se obtienen sus nauplios a partir de un material prácticamente inerte, fácilmente manipulable y almacenable como son los quistes o huevos de resistencia, hacen que en la actualidad la *Artemia* sea un bioindicador ecotoxicológico apropiado para ambientes acuáticos contaminados y una importante herramienta para estudios toxicológicos.

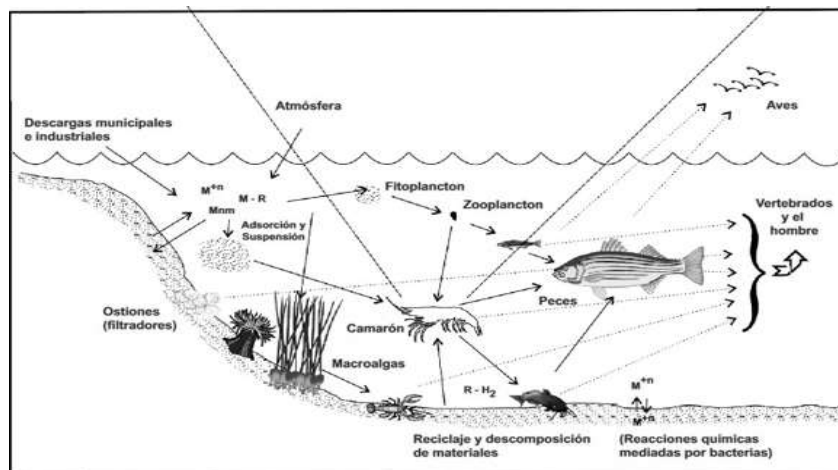


Figura 12. Ruta y bioacumulación de los metales pesados en el ambiente costero y lagunar. M^{+n} ión metálico libre, M^{+n} m pares iónicos, $M-R$ complejos metálicos (Páez-Osuna & Frías-Espicúeta, 2001).

2.3.1. Biología y ecología de la *Artemia*.

La *Artemia* es uno de los animales acuáticos más importantes utilizados en la industria de la acuicultura. Fue reportado por primera vez en Urmia Lake en 982 por un geógrafo iraní desconocido (Asem, 2008), y luego en 1756 Schlösser fotografió ambos sexos claramente. Linneo (1758) lo describió como *Cáncer salinus*, pero 61 años después, Leach (1819) lo transfirió a *Artemia salina*.

Tabla 5. Taxonomía y biogeografía de *Artemia* (Martin & Davis, 2001).

Taxonomía de <i>Artemia</i>	
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustacea
Clase	Branchiopoda
Subclase	Sarsostraca

Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	<i>Artemia</i> Leach, 1819
Especies	➤ <i>A. salina</i>: Mar Mediterráneo ➤ <i>A. monica</i>: USA (Mono Lake; California) ➤ <i>A. urmiana</i>: Irán (Lago Urmia; Proviencia Occidental de Azerbaijan) ➤ <i>A. franciscana</i>: América, Estados Unidos, islas del Caribe y del Pacífico. ➤ <i>A. persimilis</i>: Argentina y Sudamérica ➤ <i>A. sinica</i>: Asia Central y Oriental ➤ <i>A. tibetiana</i>: China (Tibet) y Europa ➤ <i>Artemia sp.</i>: Kazajastan ➤ <i>A. Parthenogenetica</i>: Europa, Africa, Asia y Australia

El género *Artemia* engloba a un grupo de crustáceos caracterizados por estar dotados de apéndices torácicos en forma de hoja, que ejercen funciones locomotoras, respiratorias y filtradoras, y por la ausencia de un caparazón rígido (Ruiz, 2008).

La *Artemia* habita exclusivamente en ecosistemas hipersalinos, su hábitat natural comprende aguas salinas y lagos salados, situados en zonas costeras o en entornos continentales. El éxito en la inoculación de la *Artemia* en diferentes zonas de todo el mundo y su amplia distribución natural en diferentes ambientes continentales y litorales, es atribuido a su gran capacidad de adaptación y tolerancia a diversas situaciones medioambientales (Ruiz, 2008). Uno de los rasgos más notables de la *Artemia* es su capacidad para habitar aguas de salinidades extremas (desde 10-20 g/L a más de 300 g/L), pudiéndose encontrar poblaciones de este crustáceo en lagos salados clorurados, sulfatados, carbonatados y potásicos.

La *Artemia* también tolera un amplio rango térmico. La temperatura vital óptima está alrededor de 25-27 °C, estableciéndose los umbrales mínimos y máximos de

supervivencia entre 6 y 35 °C, aunque estos límites no son fijos y están ligados a las características de cada población. Además, tolera normalmente niveles de oxígeno de 1 g/L. En ambientes con carencia de oxígeno, desarrolla una intensa coloración rojiza debida a un incremento en la concentración de hemoglobina en su hemolinfa, incremento que posibilita captar mayor cantidad de oxígeno sin una elevación apreciable de su tasa respiratoria (Ruiz, 2008).

2.3.2. Morfología y ciclo de vida.

El cuerpo de la *Artemia*, puede distinguirse tres partes bien diferenciadas: cabeza, tórax y abdomen como se puede observar en la figura 12. Su tamaño oscila entre 7 y 12 mm de longitud, aunque puede alcanzar los 17-18 mm (Sarabia, 2002), en la cabeza se distinguen los restos del ojo naupliar, los ojos compuestos, anténulas y antenas que en las hembras adoptan una forma sencilla y que en los machos presentan una porción anterior ensanchada en forma de tenaza (es una de las diferencias entre *Artemia* macho y hembra) (figuras 13 y 14).

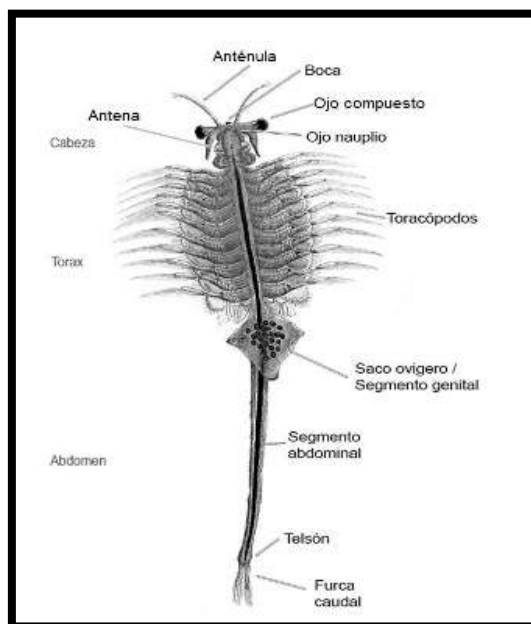


Figura 13. Morfología de la *Artemia*. (Yockteng F. 2017 Biología de la *Artemia* <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/>).

Su tórax consta de once segmentos bien definidos dotados, cada uno, de un par de apéndices torácicos (toracópodos), son los que le permiten la natación, la respiración y la alimentación ya que producen pequeñas corrientes de agua que hacen que la comida llegue a su boca.

Por último, el abdomen está formado por ocho segmentos, siendo los dos más próximos al tórax los segmentos genitales. Estos dos primeros segmentos abdominales están hipertrofiados en su cara ventral, dando lugar a los respectivos aparatos sexuales: bolsa ovígera o útero en las hembras y vesícula seminal y pene en los machos (figura 14). El último de los segmentos corresponde al telson el cual a su vez lleva un par de furcas caudales en su fin (Sarabia, 2002).

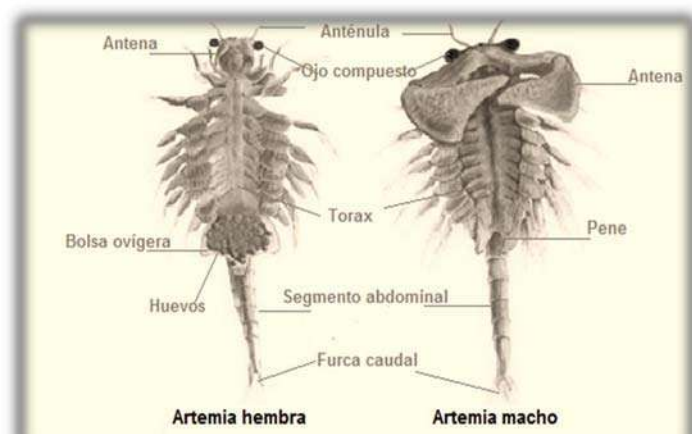


Figura 14. Diferencias entre el macho y la hembra de la *Artemia*. (Fao, 2010. cultivo de la *Artemia salina*. <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S04.htm>)

La *Artemia* tiene la capacidad de producir huevos císticos, de larga duración y resistencia, también llamados quistes. Los quistes pueden ser desecados y mantenidos en condiciones adecuadas, y mantenerse viables durante largos periodos de tiempo. Una vez hidratados, se reinicia el metabolismo interno, después de 24 h la membrana externa del quiste se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión, después el embrión abandona la cáscara del quiste colgado del cascarón vacío a donde todavía se encuentra unido. Dentro de la membrana de eclosión se

completa el desarrollo del nauplio, y culmina cuando se rompe dicha membrana y sale el exterior, nadando libremente, alcanzando el estado de nauplio (figura 15) (Sarabia, 2002).

En el primer estado larvario (estado I), conocido como nauplio, tiene un tamaño entre 400 y 500 micras de longitud, de color pardo anaranjado y posee tres pares de apéndices: el primer par de antenas (también llamadas anténulas, tienen una función sensorial), el segundo par de antenas (con función locomotora y filtradora) y las mandíbulas (con una función de toma de alimento). Su aparato digestivo no es todavía funcional (permaneciendo aún cerrados la boca y el ano) (Sarabia, 2002).

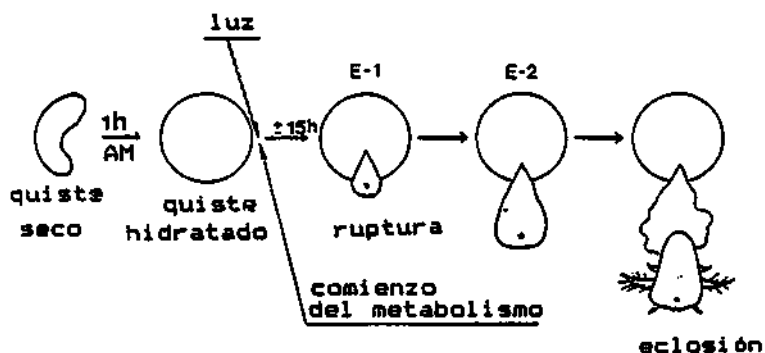


Figura 15. Desarrollo del quiste de *Artemia* desde la incubación en agua de mar (AM) hasta la liberación del nauplio (Fao, 2010. Cultivo de *Artemia Salina*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB474S/AB474S03.htm>).

A las 24 h, se produce una muda, pasando al segundo estado larvario (estado II). En esta fase el aparato digestivo ya es funcional y el segundo par de antenas filtra partículas alimenticias de un tamaño de 1 a 40 micras. Además, la *Artemia* es un crustáceo filtrador pasivo que basa su alimentación en la captura de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritos del medio en que vive. Durante su desarrollo, la larva realiza 15 mudas, durante las cuales van apareciendo los toracópodos y se desarrollan los dos ojos laterales complejos. En este estado ya se pueden observar las antenas en forma de pinzas en los machos y las antenas en las

hembras pasan a ser órganos sensoriales. Cuando los toracópodos ya están completamente formados presentan tres partes funcionales: los telopoditos y endopoditos con acciones locomotrices y filtradoras, y los exopoditos que actúan como branquias (Sarabia, 2002).

La *Artemia* adulta se caracteriza por un cuerpo alargado con dos ojos complejos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. Puede llegar a vivir por un tiempo aproximado de cuatro meses (Sarabia, 2002).

El macho posee un par de piezas prensiles musculadas muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se puede observar un par de penes. La hembra es fácilmente reconocida por su útero que está situado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos. La precópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el útero y el último par de toracópodos, con sus antenas curvas (Sarabia, 2002).

Las parejas pueden nadar de esta forma durante largo tiempo es lo que se conoce como posición de monta (figura 16), para lo cual mueven sus toracópodos de forma sincrónica. La cópula es un rápido acto reflejo donde la parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes se introduce en la abertura del útero, fertilizando los huevos. Los huevos se desarrollan en dos ovarios tubulares situados en el abdomen, pueden contener hasta más de 200 huevos. Una vez maduros, tienen forma esférica y se desplazan hasta el útero a través de dos oviductos (también llamados sacos laterales) (Sarabia, 2002).

Después de esta fertilización se pueden presentar dos tipos de reproducción: si las condiciones ambientales son favorables se inicia el metabolismo embrionario, desarrollándose los nauplios nadadores que luego son depositados por la hembra (a esto se le llama reproducción Ovovivípara); si las condiciones ambientales son adversas, las glándulas del útero de la hembra secretan una sustancia color café que enquistan los embriones o cistos, los cuales entran en un estado de latencia y son

liberados en forma de quistes (a este proceso se le llama reproducción Ovípara) (Sarabia, 2002).

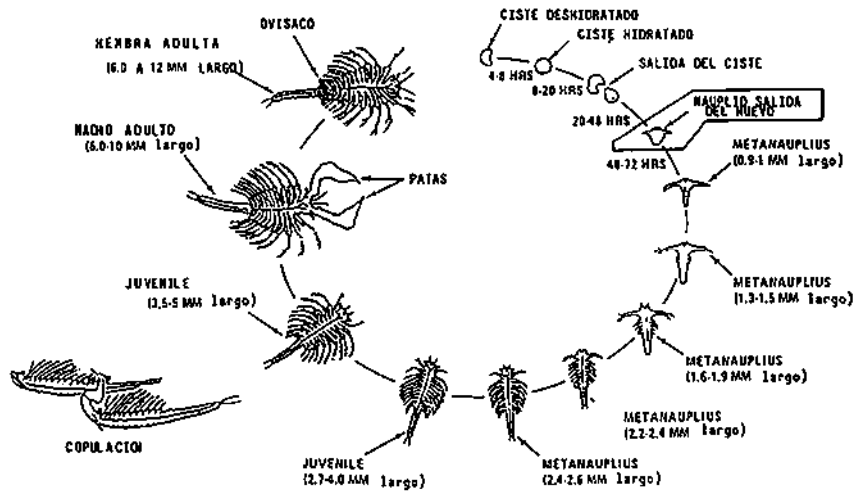


Figura 16. Crecimiento progresivo de las *Artemias*. (Fao, 2010. Crecimiento de las artemias. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB474S/AB474S03.htm>).

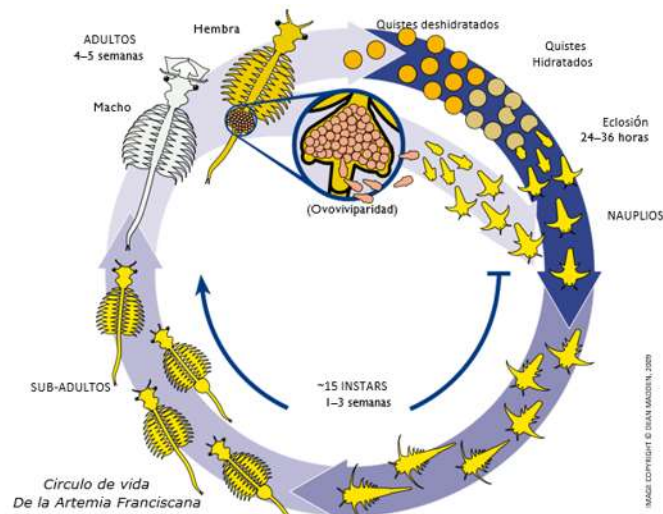


Figura 17. Ciclo de vida de la *Artemia franciscana* (Madden, 2009).

El desarrollo del embrión hasta la eclosión dura aproximadamente 24 h en condiciones adecuadas, llegando a su fase adulta en 20-30 días de vida libre alcanzando un tamaño medio de 7 mm (figura 17) (Sorgeloos, 1986; Castro & Córdova, 2003).

Existen muchas especies de *Artemia*, las más conocidas son *Artemia franciscana* y *Artemia salina*, siendo el nombre de esta última el más utilizado erróneamente por algunas personas para referirse a las *Artemia* en general y sobre todo a la especie que se comercializa a nivel mundial que es *Artemia franciscana* la cual por lo anterior es la que se utilizó en esta investigación abordándola en el siguiente apartado.

2.3.3. *Artemia franciscana*.

Conforme lo anterior expuesto, se considera a la *Artemia franciscana*, qué es un microcrustáceo, branquiópodo perteneciente al orden Anostraca, la cual habita en aguas con altas concentraciones de sal. Esta es la especie de *Artemia* que comúnmente se comercializa para fines alimenticios en acuicultura y acuariofilia por su gran abundancia. Resiste mejor los factores abióticos, lo que ha sido demostrado al observarse sobrevivencia y fecundidad significativamente mayor que las de otras especies (Triantaphyllidis, et al., 1995; Barata, et al., 1996). Además, tiende a presentar mejor éxito de colonizador si se introduce en nuevos hábitats, desplazando a la fauna nativa (Williams & Geddes, 1881). *A. franciscana* es dominante en el nuevo mundo, y se encuentra distribuida desde Canadá hasta la zona central de Chile. Esta especie en México se encuentra en “Las Salinas de Hidalgo”, San Luis Potosí, “Casa Blanca”, Cuatro Ciénagas, Coahuila, Yavaros, Ecatepec, Ceuta y San Crisanto (Correa, et al., 1993; Malpica, et al., 2004).

La norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI establece un método biológico para la evaluación de la calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando como bioindicador *A. franciscana*. Aplicable para la evaluación de toxicidad aguda

en cuerpos de agua salobres y marinos, así como aguas residuales industriales, municipales y agrícolas, lixiviados, sustancias puras o combinadas y extractos acuosos con salinidades mayores a diez.

Debido a la facilidad de su cultivo, corto ciclo de vida, y a su distribución cosmopolita, la *Artemia* ha ganado popularidad como organismo de prueba en estudios de toxicología y es una alternativa al uso de otros invertebrados por la posibilidad de obtener organismos neonatos de forma sincrónica y con una condición fisiológica uniforme. Otra característica que hace a este organismo útil es estudios en toxicología es que puede ser cultivado en salinidades que varían entre 5 y 150 ups y se adapta a un amplio intervalo de condiciones ambientales.

3. Justificación.

En la industria de la acuicultura se realiza un gran intercambio de sustancias con el ecosistema acuático, alguna de ellas siendo desinfectantes, antifúngicos, y fármacos, entre otras. La presencia y la evaluación ecotoxicológica de estas sustancias en el ambiente acuático es un área de investigación emergente a nivel global. La gran cantidad de mezclas químicas que aparecen, llevan a una gran complejidad al momento de evaluar la calidad de un ecosistema, por ello es importante evaluar el impacto que podrían tener en la cadena trófica, y al utilizar especies planctónicas como bioindicadores, caso de *Artemia franciscana*, se pueden alcanzar datos para dar posibles alertas tempranas de peligros ambientales, ya que daños en los primeros niveles tróficos, determinarán alteraciones en otros superiores; además con estos bioensayos evitamos los clásicos bioensayos en ratones tan problemáticos hoy en día ante temas de bioética. La obtención de datos como concentraciones letales de metales como el cobre presente en el sulfato de cobre, soluciones o fármacos veterinarios como el verde de malaquita y desinfectantes como el hipoclorito de sodio son de gran importancia ya que podrían ayudar a mejorar la normatividad para el uso adecuado de estas sustancias químicas, sobre todo ante la escasa información relacionada tanto con su efecto individual como sus mezclas debido a que existe muy

poca información y normatividad respecto al uso de estas sustancias en combinación con otros plaguicidas y desinfectantes, siendo que algunas no sean peligrosas a las cantidades permitidas pero que en contacto con otra sustancia pueda tener un efecto aditivo, antagónico, sinérgico entre otros.

4. Hipótesis.

La presencia de sustancias como verde de malaquita, hipoclorito de sodio y metales como el cobre del sulfato de cobre, utilizadas en acuicultura y su interacción en conjunto dentro de los ecosistemas acuáticos generan respuestas toxicas a corto plazo (24 h) sobre el bioindicador *Artemia franciscana*.

5. Objetivo general.

Evaluar el impacto tóxico agudo que supone la presencia de sustancias como el verde de malaquita, el hipoclorito sódico y el sulfato de cobre al estudiar su efecto tanto de manera individual como en conjunto sobre un representante del zooplancton.

5.3. Objetivos específicos.

Determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) del verde de malaquita a las 24 h de exposición sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

Determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) del hipoclorito sódico a las 24 h de exposición sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

Determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) del sulfato de cobre a las 24 h de exposición sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

Indicar la concentración más alta a la cual no se observa efecto en 24 h (24 h-NOEC) del verde de malaquita, hipoclorito sódico y sulfato de cobre sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

Determinar tanto individualmente como en su mezcla su posible efecto sinérgico, aditivo o antagónico de estas sustancias.

6. Material y métodos.

6.3. Sustancia de ensayo.

Se realizó la dilución del agente en agua marina (Sera Premium, Germany) para la obtención de concentraciones exponenciales de 1-100mg/L como máxima concentración de verde de malaquita (MERCK), hipoclorito sódico (MEYER) y sulfato de cobre (II) (MERCK).

6.4. Agua marina.

La preparación de agua marina se realizó a partir 35 g de sal marina de la Marca Sera PREMIUM, libre de nitratos, fosfatos y silicatos; la cual se disolvió en 1000 mL de agua destilada hasta alcanzar una concentración del 35% de salinidad y se ajustó a un pH entre un rango de 8-8.6.

Se realizó la dilución de cada uno de los compuestos en agua marina sintética para la obtención de las diferentes concentraciones exponenciales para el sulfato de cobre, se trabajó con un rango de 10-50mg/L, para el hipoclorito de 5-10 mg/L y por último para el verde de malaquita se trabajó con un rango de concentraciones de 1.5-25 mg/L.

6.5. Material biológico.

Nauplios de 24h de *Artemia franciscana* serán obtenidos a partir de la hidratación de quistes (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) a 4°C por 12h y posterior incubación a 28°C en agua marina (Sera Premium, Germany) a 34ppt de salinidad pH de 8.4±0.2 a 24h a una intensidad de fotones de 18.5-20µmol/m²s (1000lux).

6.6. Determinación de mortalidad en *Artemia franciscana*.

La metodología para la determinación de las Concentraciones Letales 50% (CL_{50}) se basa en la descrita por Persoone et al., 1989 y por Sánchez-Fortún et al., 1994, que consiste en la determinación de la concentración que causa la muerte del 50% de nauplios de 24h de *Artemia* sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos (Sarstedt Inc., USA). En cada pocillo se incluyen 10 nauplios de 24h de *Artemia* los cuales son expuestos a las distintas concentraciones del agente verde de malaquita, hipoclorito sódico y sulfato de cobre en un volumen total de 1ml (1000 μ l). Para cada concentración del agente químico se establece un control y cuatro repeticiones con un número de ensayos a 8, se incuban las placas a 28°C por 24h. Para determinar el número de nauplios muertos en cada pocillo (considerándose muertos aquellos que no presentaron movilidad durante 10 segundos observados en el estereoscopio), se realiza la lectura a través de estereoscopio (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) a las 24h de exposición en ambiente de oscuridad.

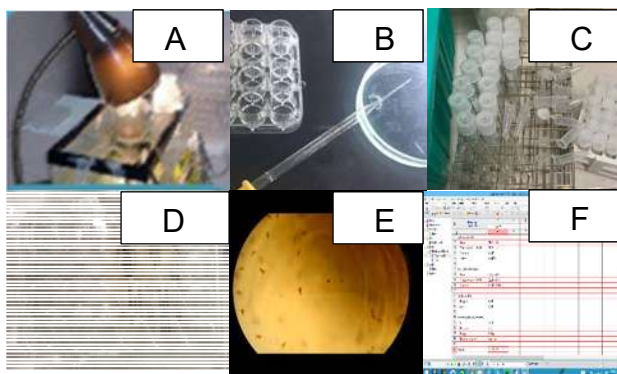


Figura 18. A: Incubación de los quistes de *A. franciscana*. B: Distribución de los 10 nauplios de *A. franciscana* en placas multipocillo. C: Exposición de los nauplios a las diferentes concentraciones de los compuestos durante 24 h. D: Incubación de las placas a 28 °C durante 24 h. E: Lectura de los nauplios vivos y muertos en el estereoscopio. F: Obtención de las concentraciones letales (CL_{50}).

6.7. Análisis de datos.

Los valores de las CL_{50} por 24h y NOEC (24 h) sobre *Artemia franciscana* serán obtenidos por regresión lineal a través de la relación de Concentración-Respuesta por análisis ANOVA de 1 vía (Finney, 1971). La prueba de distribución normal de los datos se realiza a través de la prueba D'Agostino y Pearson. Para determinar las diferencias estadísticas entre cada valor de CL_{50} (24 h), se realizó a través de la comparación múltiple por ANOVA Test de Tukey utilizando un intervalo de confianza de $p < 0.05$. Los cálculos estadísticos son realizados por el paquete estadístico Graphpad Prism v5.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

7. Resultados.

Se determinó la toxicidad aguda a 24 h de exposición de los compuestos metálicos del sulfato de cobre, el verde de malaquita e hipoclorito sódico, sobre nauplios de *A. franciscana* por medio de la determinación de la respuesta CL_{50} de cada compuesto ensayado tanto en su forma individual como en mezcla.

7.1. Respuesta individual del sulfato de cobre, verde de malaquita e hipoclorito sódico.

Para el hipoclorito sódico se observó una toxicidad elevada en bajas concentraciones con respecto a su respuesta de concentración letal 50 a 24 h de 0.0046 mg/L, mientras que para el sulfato de cobre y el verde de malaquita fue de 13.74 mg/L y 8.32 mg/L siendo más elevada la concentración para provocar la muerte del 50% de la población evaluada presentando una toxicidad a corto plazo relativamente baja; en la Tabla 6 se muestran los valores de la 24 h-NOEC, la CL_{50} y a 24 h de cada compuesto respectivamente con sus límites de confianza del 95%.

Conforme a la clasificación propuesta por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) para categorizar a las sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos para toxicidad aguda (CL_{50} en mg/L), se encuentra que en la categoría o clase I se clasifican

las sustancias con una $CL_{50} \leq 1$ mg/L, es decir, en sustancias altamente tóxicas para organismos acuáticos, en la categoría II se encuentran las sustancias con una $CL_{50} > 1 - \leq 10$ mg/L en sustancias tóxicas para organismos acuáticos, en la categoría III con una $CL_{50} > 10 - \leq 100$ mg/L en sustancias peligrosas para el ambiente acuático y en la categoría IV con una $CL_{50} > 100$ mg/L como sustancias nocivas para los organismos acuáticos según la clasificación de la EPA. Por consiguiente, el hipoclorito sódico expuesto a nauplios de *A. franciscana* puede clasificarse dentro de la categoría I, es decir, en sustancias altamente tóxicas para organismos acuáticos, el verde de malaquita se encuentra en la categoría II sustancias tóxicas para organismos acuáticos, mientras que el sulfato de cobre entra como categoría III, es decir una sustancia peligrosa para el ambiente acuático.

Tabla 6. Índices de toxicidad (CL_{50} (24 h) Y 24 h-NOEC) de los tres compuestos expuestos en forma individual sobre *A. franciscana*.

Verde de malaquita	
Índice	Valor en mg L ⁻¹ (L.C. 95%)
24H-NOEC	1.55 (0.88-2.26)
CL₅₀(24)	8.32 (6.30-11.56)
r	0.99
Y=68.61X-13.13	
Hipoclorito sódico	
Índice	Valor en mg L ⁻¹ (L.C. 95%)
24H-NOEC	0.00093 (0.00033-0.0016)
CL₅₀(24)	0.0046 (0.0028-0.0058)
r	0.98
Y= 77.97X-236.4	
Sulfato de cobre	
Índice	Valor en mg L ⁻¹ (L.C. 95%)
24H-NOEC	2.99 (1.44-4.68)

CL₅₀₍₂₄₎	13.74 (10.54-16.44)
r	0.99
Y= 75.47X-35.87	

En el Gráfico 1 se muestra la recta correspondiente de la relación de la concentración-respuesta lineal a 24 h del verde de malaquita sobre *A. franciscana*, el valor del coeficiente de variación (r^2) nos indica que si existe una fuerte correlación entre la concentración y la letalidad del verde de malaquita: a medida que aumenta la concentración es mayor su letalidad.

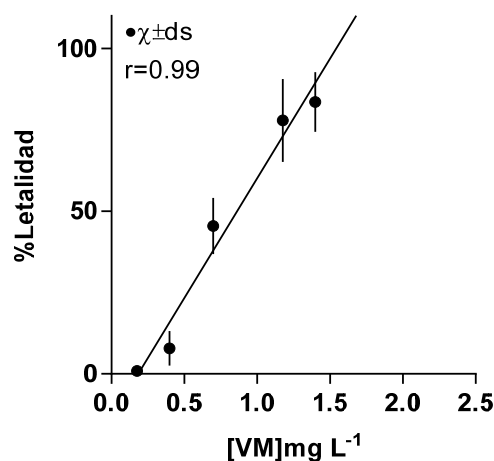


Grafico 1. Relación Concentración-Respuesta lineal del verde de malaquita sobre nauplios de 24 h de *Artemia franciscana*. Cada punto (•) representa la media $\pm$ su desviación estándar ($\mu \pm \sigma$).

De la misma manera se comporta el hipoclorito sódico (gráfico 2) y el sulfato de cobre solo que para este último sus concentraciones se encuentran más próximas como se muestra en la recta del Gráfico 3.

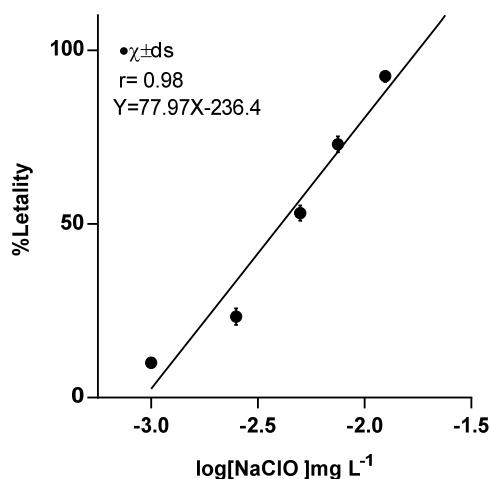


Gráfico 2. Relación Concentración-Respuesta lineal del NaClO sobre nauplios de 24 h de *Artemia franciscana*. Cada punto (•) representa la media $\pm$ su desviación estándar ($\mu \pm \sigma$).

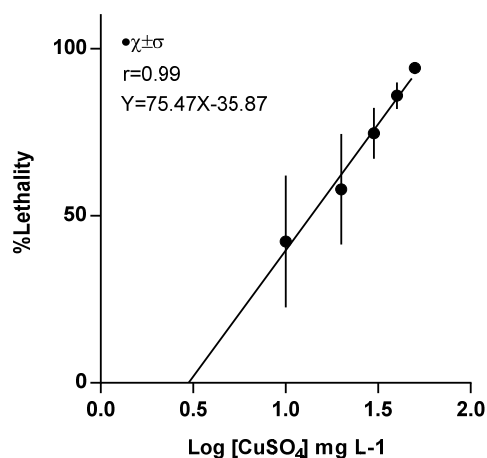


Gráfico 3. Relación Concentración-Respuesta lineal del sulfato de cobre sobre nauplios de 24 h de *Artemia franciscana*. Cada punto (•) representa la media $\pm$ su desviación estándar ($\mu \pm \sigma$).

7.2. Resultados de las mezclas de verde de malaquita, hipoclorito sódico y sulfato de cobre.

Para la mezcla del sulfato de cobre con verde de malaquita al inicio fue fuertemente antagónica ya que el Índice de combinación (IC) de las primeras es mayor a 1, pero, a efectos mayores (95%) la respuesta fue sinérgica (es decir, menor a 1) por lo que a medida que aumenta la concentración del sulfato de cobre se observó que su Índice de reducción de dosis (DRI) es mayor (tabla 7), con la pendiente totalmente pronunciada (gráfico 4), mientras que para la mezcla de sulfato de cobre con hipoclorito de sodio la respuesta fue al inicio aditiva (es decir, IC=1) pero conforme se incrementa se volvió levemente antagónica con un IC mayor a 1 con la pendiente no pronunciada (gráfico 5) y el DRI es menor, conforme aumenta la concentración a diferencia de la anterior.

Con respecto al verde de malaquita e hipoclorito de sodio sucede que a efectos bajos se presentó antagonismo teniendo un IC mayor a 1, mientras que a efectos máximos la respuesta fue un sinergismo elevado con un IC menor a 1, respecto a su DRI se observó que este aumenta conforme incrementa su concentración (tabla 7), con su pendiente totalmente pronunciada (gráfico 6).

Tabla 7. Índice de Combinación e Índice de Reducción de Dosis (DRI) en mezclas de los tres compuestos.

Mezcla	% Efecto	Índice de Combinación (IC)	Índice de Reducción de Dosis/Concentración (DRI)
CuSO ₄ /C ₂₃ H ₂₅ ClN ₂	10	360.36	VM= 0.07 Cu= 0.003
	25	64.12	VM= 0.38 Cu= 0.016
	50	11.41	VM= 2.09 Cu= 0.091
	75	2.03	VM= 11.39 Cu= 0.51
	95	0.11	VM= 197.07 Cu= 9.38
CuSO ₄ /NaClO	10	1.36	Cu= 1.76 NaClO= 1.27
	25	1.47	Cu= 1.63 NaClO= 1.17
	50	1.59	Cu= 1.50 NaClO= 1.08
	75	1.73	Cu= 1.39 NaClO= 0.99
	95	1.98	Cu= 1.22 NaClO= 0.86
C ₂₃ H ₂₅ ClN ₂ /NaClO	10	123.09	VM= 0.28 NaClO= 0.01

	25	8.41	VM= 4.01 NaClO= 0.12
	50	0.58	VM= 57.18 NaClO= 1.79
	75	0.04	VM= 815.7 NaClO= 26.3
	95	0.0004	VM= 70932.1 NaClO= 2388.9

El DRI corresponde al Índice de Reducción de Dosis cuyos valores mayores se muestran en respuestas sinérgicas y valores menores por debajo de 1 indican un antagonismo. Asimismo, a valores menores 1 de cada compuesto indican cual es de mayor toxicidad o incremento de respuesta en combinación.

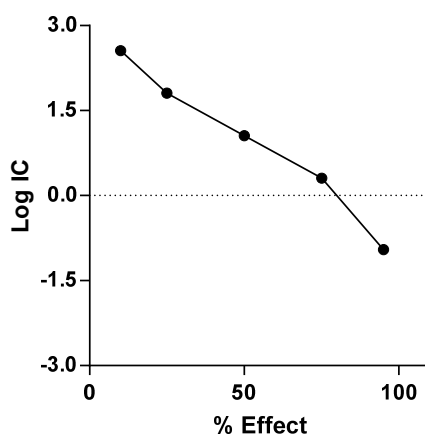


Gráfico 4. Mezcla de CuSO_4 /VM.

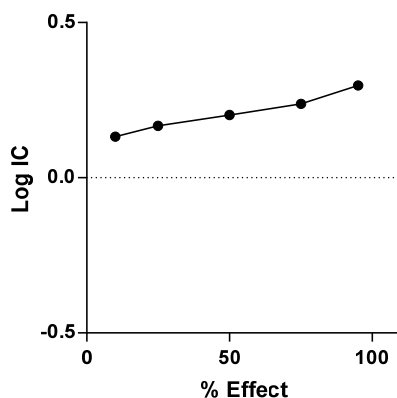


Gráfico 5. Mezcla de CuSO_4 /NaClO.

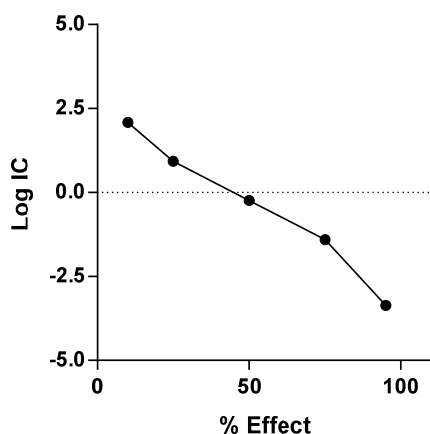


Gráfico 6. Mezcla de VM/NaClO.

En el gráfico 7 se muestra que en las rectas del CuSO_4/VM y del VM/NaClO tienen una pendiente prolongada negativa ya que los valores IC van de mayor 1 disminuyendo a menor 1, mientras que la de $\text{CuSO}_4/\text{NaClO}$ es menos prolongada positiva siendo esta igual a 1 pero conforme incrementa la concentración se elevó levemente a un valor mayor a 1 con respecto a las anteriores.

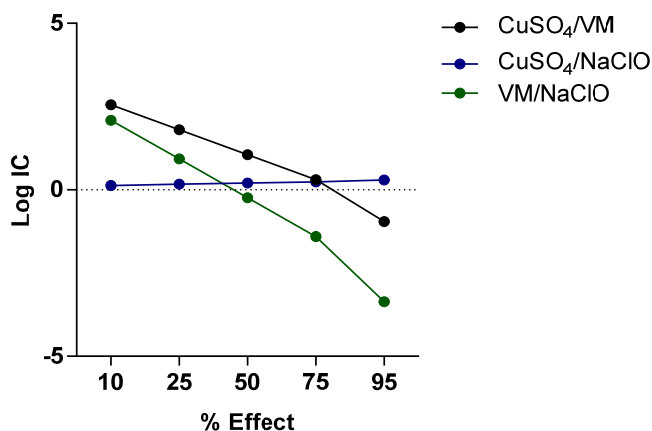
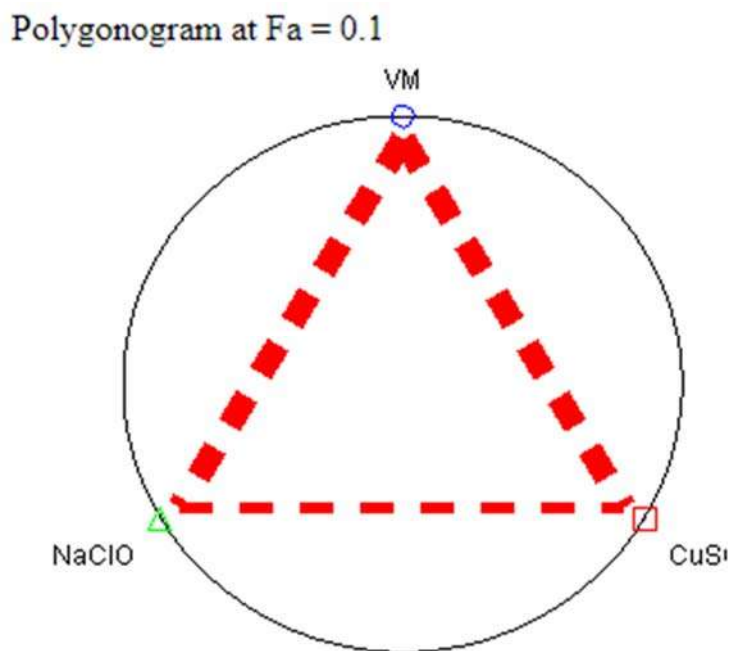


Gráfico 7. Comparación de las 3 mezclas binarias.

En los siguientes poligonogramas de efectos se muestran las mezclas del sulfato de cobre, verde de malaquita e hipoclorito sódico a diferentes porcentajes, en un 10% se señaló una respuesta antagónica por parte de los tres compuestos, la línea

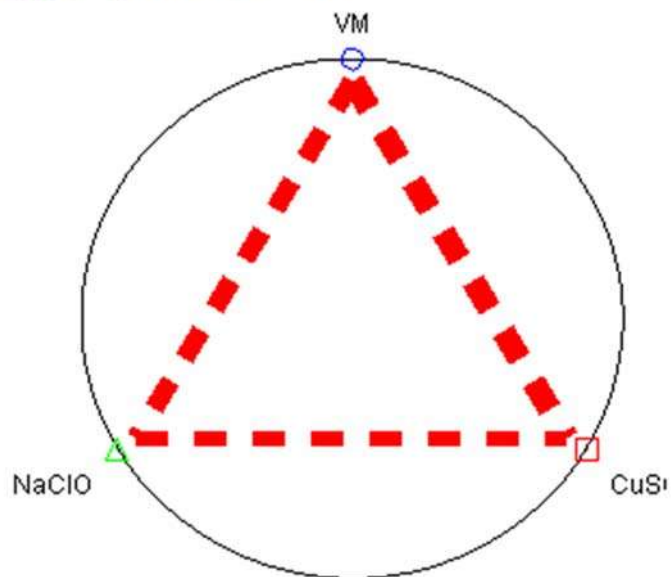
punteada más delgada indica menor acción antagónica que fue en la mezcla de NaClO/CuSO₄ (poligonograma 1), para un 25 % de efecto presento una respuesta antagónica por parte de los tres compuestos a un mismo nivel (poligonograma 2), para un 50% se presentó una respuesta sinérgica del CuSO₄/VM, una respuesta antagónica mayor para CuSO₄/VM que para el NaClO/CuSO₄ (poligonograma 3).

Para un 75% de efecto se obtuvo una respuesta parecida a la del 50% solo que la respuesta antagónica fue a un mismo nivel para la mezcla de CuSO₄/VM y para la de NaClO/CuSO₄ (poligonograma 4) y por ultimo para un 95% de efecto se obtuvo una respuesta sinérgica para NaClO/VM y VM/CuSO₄ y para CuSO₄/NaClO se obtuvo una respuesta antagónica (poligonograma 5).



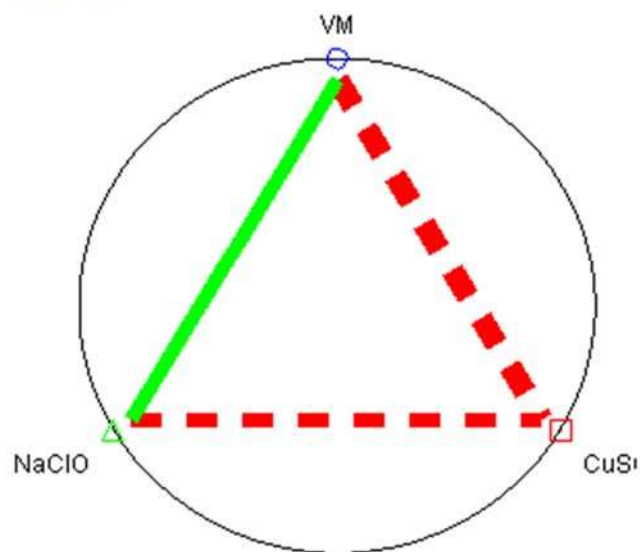
Poligonograma de efecto 6. Respuesta antagónica al 10% de efecto.

Polygonogram at $F_a = 0.25$



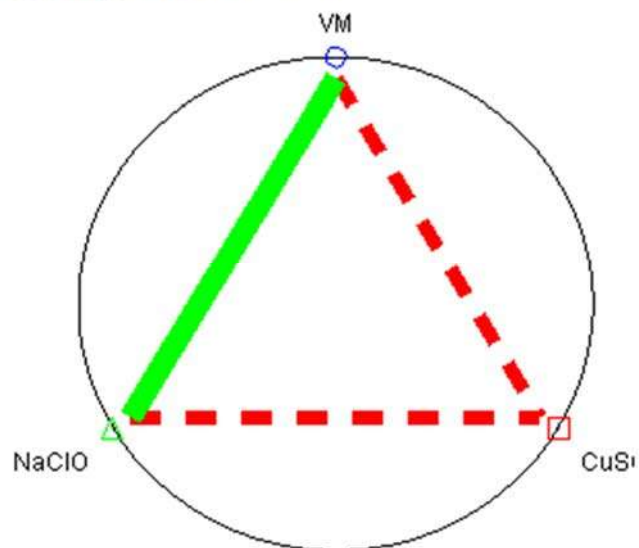
Poligonograma de efecto 7. Respuesta antagónica en todas las mezclas al 25% de efecto.

Polygonogram at $F_a = 0.5$



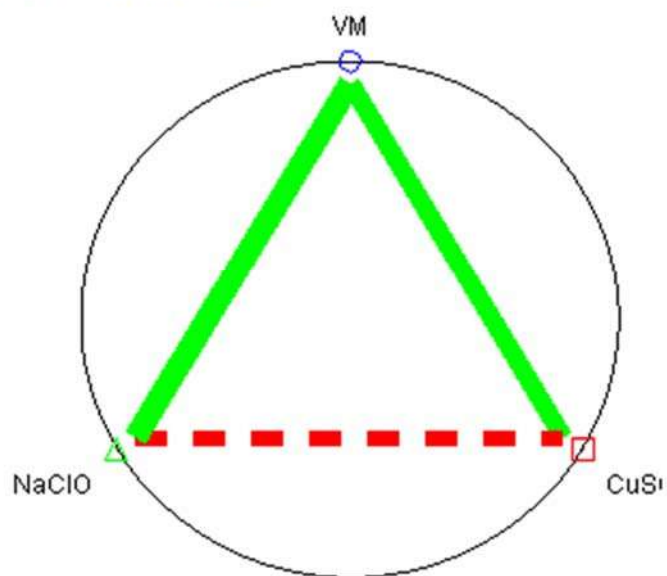
Poligonograma de efecto 8. Respuesta sinérgica y antagónica al 50% de efecto.

Polygonogram at $F_a = 0.75$



Poligonograma de efecto 9. Respuesta sinérgica y antagónica al 75% de efecto.

Polygonogram at $F_a = 0.95$



Poligonograma de efecto 10. Respuesta sinérgica y antagónica al 95% de efecto.

7.2.1. Mezclas binarias con respecto a las concentraciones utilizadas en Acuicultura.

A las concentraciones que se manejan usualmente en acuicultura la respuesta en la mezcla de CuSO₄/VM es antagónica en un principio, pero después declina a sinergismo. Para sulfato de cobre con hipoclorito sódico la respuesta es antagónica al inicio, pero declina hacia el sinergismo para después “repuntar” en antagonismo. Con respecto a VM e hipoclorito sódico el efecto es antagónico a efectos bajos, mientras que se incrementa el efecto la respuesta se vuelve aditiva (tabla 8).

Tabla 8. Mezclas binarias con respeto a las concentraciones utilizadas a Acuicultura.

Mezcla [Relación] mg l ⁻¹	% Efecto	Índice de Combinación
CuSO ₄ /VM [100:3]	42	4.41
	58	5.21
	75	1.23
	86	1.11
	94	0.83
CuSO ₄ /NaClO [100:0.04]	42	2.04
	58	2.87
	75	1.18
	86	1.19
	94	1.91
VM/NaClO [3:0.04]	10	16.95
	23	1.23
	53	1.20
	73	1.12

7.2.2. Comparación múltiple por ANOVA Test de Tukey.

Para determinar si existían diferencias significativas se utilizó la comparación múltiple por ANOVA test de Tukey tomando cada una de las concentraciones de los tres compuestos a las que se trabajaron y, los datos de media y desviación estándar

(tabla 9), para poder hacer el estudio se sacaron mediante regresión lineal los valores que serían de cada compuesto a todas las concentraciones que se trabajaron en total de los compuestos (tabla 10).

Tabla 9. Concentraciones a la que se trabajaron de cada compuesto con su respectiva media y desviación estándar.

Hipoclorito sódico.	
<u>Concentración</u>	<u>Media ± desviación estándar</u>
5 mg/L	30.7 ± 16
6 mg/L	52.7 ± 15
7 mg/L	70.8 ± 16
8 mg/L	77.6 ± 17
10 mg/L	97.3 ± 5
Sulfato de cobre.	
<u>Concentración</u>	<u>Media ± desviación estándar</u>
10 mg/L	42.3 ± 19.7
20 mg/L	57.9 ± 16.5
30 mg/L	74.7 ± 7.6
40 mg/L	85.9 ± 4
50 mg/L	94.16 ± 1.8
Verde de malaquita	
<u>Concentración</u>	<u>Media ± desviación estándar</u>
1.5 mg/L	0.8 ± 1.4
2.5 mg/L	7.8 ± 5.4
5.0 mg/L	45.4 ± 8.7
15.0 mg/L	77.9 ± 12.8
25 mg/L	83.5 ± 9.1

Tabla 10. Total de concentraciones de los tres compuestos con su respectiva media y desviación estándar, y sus ecuaciones.

Concentración (mg/L)	Hipoclorito sódico $\mu \pm \sigma$	Sulfato de cobre $\mu \pm \sigma$	Verde de malaquita $\mu \pm \sigma$
1.5	0.01 $\pm$ 11.2	0.01 $\pm$ 7.4	0.8 $\pm$ 1.4
2.5	0.01 $\pm$ 7.6	0.01 $\pm$ 6.2	7.8 $\pm$ 5.4
5	30.7 $\pm$ 16	16.9 $\pm$ 4.5	45.4 $\pm$ 8.7
6	52.7 $\pm$ 15	22.9 $\pm$ 4	40.3 $\pm$ 2.6
7	70.8 $\pm$ 16	27.9 $\pm$ 3.7	44.9 $\pm$ 2.6
8	77.6 $\pm$ 17	32.3 $\pm$ 3.3	48.8 $\pm$ 2.7
10	97.3 $\pm$ 5	42.3 $\pm$ 19.7	55.5 $\pm$ 2.9
15	99.9 $\pm$ 5.7	52.9 $\pm$ 2	77.9 $\pm$ 12.8
20	100 $\pm$ 7.7	57.9 $\pm$ 16.5	76.1 $\pm$ 4
25	100 $\pm$ 9.3	69.6 $\pm$ 1.5	83.5 $\pm$ 9.1
30	100 $\pm$ 10.6	74.7 $\pm$ 7.6	88.2 $\pm$ 4.8
40	100 $\pm$ 12.6	85.9 $\pm$ 4	96.8 $\pm$ 5.4
50	100 $\pm$ 14.2	94.2 $\pm$ 1.8	100 $\pm$ 5.9
Ecuación	$Y = 217.2X - 117.7$	$Y = 75.47X - 35.87$	$Y = 68.61X - 13.13$

Analizando las ecuaciones de cada compuesto (tabla 10) se obtiene que el hipoclorito sódico es el más toxico, seguido del sulfato de cobre y por último el verde de malaquita, debido a la cantidad que se refleja en su pendiente, entre mayor sea la pendiente mayor será su toxicidad.

Retomando el estudio ANOVA y con base a lo anterior tenemos la siguiente hipótesis:

$$H_0: \mu^1 = \mu^2 = \mu^3$$

$$H_a: \mu^1 \neq \mu^2 \neq \mu^3$$

En la mayoría de los casos el p-valor asociado al valor encontrado es menor que $\alpha=0,05$, por lo tanto rechazamos la hipótesis nula y aceptamos que hay diferencias entre las medias de las tres mezclas (tabla 11), a diferentes niveles los cuales se indican con un código (*) entre mayor número de estos quiere decir que se encuentra más alejado que el valor de significancia (menor); excepto para el caso de las mezclas de NaClO/CuSO₄, NaClO/VM, CuSO₄/VM a las concentraciones de 1.5 mg/L y 50 mg/L y para el caso único de la concentración de 2.5 mg/L de la mezcla de NaClO/CuSO₄ para las cuales se obtuvo un resultado de no significancia (ns por sus siglas en ingles) para las cuales sería correcto aceptar la hipótesis alternativa.

Tabla 11. Nivel de significancia para cada una de las concentraciones de las mezclas de NaClO/CuSO₄, NaClO/VM, CuSO₄/VM con su respectivo valor de P.

Nota: Los valores de significancia están dados en forma de código, ns: non significant, ****< 0.0001, *** 0.0002, ** 0.0044.

() mg/L	NaClO vs CuSO ₄ $\mu \pm \sigma$	NaClO vs VM $\mu \pm \sigma$	CuSO ₄ vs VM $\mu \pm \sigma$	Valor de P
1.5	0.01 ± 11.2 0.01 ± 7.4 ns	0.01 ± 11.2 0.8 ± 1.4 ns	0.01 ± 7.4 0.8 ± 1.4 ns	0.9561
2.5	0.01 ± 7.6 0.01 ± 6.2 ns	0.01 ± 7.6 7.8 ± 5.4 **	0.01 ± 6.2 7.8 ± 5.4 **	0.3715
5	30.7 ± 16 16.9 ± 4.5 **	30.7 ± 16 45.4 ± 8.7 ***	16.9 ± 4.5 45.4 ± 8.7 ****	< 0.0001

6	52.7 ± 15 22.9 ± 4 ****	52.7 ± 15 40.3 ± 2.6 ***	22.9 ± 4 40.3 ± 2.6 ****	< 0.0001
7	70.8 ± 16 27.9 ± 3.7 ****	70.8 ± 16 44.9 ± 2.6 ****	27.9 ± 3.7 44.9 ± 2.6 ****	< 0.0001
8	77.6 ± 17 32.3 ± 3.3 ****	77.6 ± 17 48.8 ± 2.7 ****	32.3 ± 3.3 48.8 ± 2.7 ****	< 0.0001
10	97.3 ± 5 42.3 ± 19.7 ****	97.3 ± 5 55.5 ± 2.9 ****	42.3 ± 19.7 55.5 ± 2.9 **	< 0.0001
15	99.9 ± 5.7 52.9 ± 2 ****	99.9 ± 5.7 77.9 ± 12.8 ****	52.9 ± 2 77.9 ± 12.8 ****	< 0.0001
20	100 ± 7.7 57.9 ± 16.5 ****	100 ± 7.7 76.1 ± 4 ****	57.9 ± 16.5 76.1 ± 4 ****	< 0.0001
25	100 ± 9.3 69.6 ± 1.5 ****	100 ± 9.3 83.5 ± 9.1 ****	69.6 ± 1.5 83.5 ± 9.1 ****	< 0.0001
30	100 ± 10.6 74.7 ± 7.6 ****	100 ± 10.6 88.2 ± 4.8 ***	74.7 ± 7.6 88.2 ± 4.8 ****	< 0.0001
40	100 ± 12.6 85.9 ± 4 ****	100 ± 12.6 96.8 ± 5.4 ***	85.9 ± 4 96.8 ± 5.4 ****	< 0.0001
50	100 ± 14.2 94.2 ± 1.8	100 ± 14.2 100 ± 5.9	94.2 ± 1.8 100 ± 5.9	0.0899

	ns	ns	ns	
--	----	----	----	--

8. Discusión.

El estudio de la concentración de plaguicidas (como el verde de malaquita y el sulfato de cobre) y desinfectantes (hipoclorito sódico) en los ecosistemas acuáticos es de gran interés, ya que nos puede proporcionar posibles efectos negativos sobre la biota acuática. En el caso del desinfectante hipoclorito sódico su peligrosidad radica en la eficacia para la disolución del tejido orgánico y como también es considerado el verde de malaquita, debido a que se considera que tiene un rol altamente tóxico sobre las enzimas respiratorias. En el último caso para el sulfato de cobre su peligrosidad radica en que puede ser tóxico en pequeñas concentraciones, debido a que los organismos acuáticos tienen la capacidad de bioacumular metales y transferirlos a través de la cadena trófica, produciendo un efecto de biomagnificación en los niveles más elevados de ella. De esta forma se establece el riesgo al ser incorporados en la dieta del hombre.

En los datos recopilados durante 1992-2001 por el Programa Nacional de Evaluación de la Calidad del Agua (NAWQA) del Servicio Geológico de los EE. UU. (USGS), las corrientes estadounidenses con tierras agrícolas y / o urbanas dentro de sus cuencas tenían detecciones de 2 o más plaguicidas o degradantes en el agua, el 90% del tiempo en que se analizaron, 5 o más detecciones aproximadamente, en el 70% del tiempo, y 10 o más detecciones, aproximadamente el 20% del tiempo en que se analizaron (Nowell, et al, 2014).

El valor de la CL_{50} para el sulfato de cobre (II) obtenido en este estudio fue de 13.74 mg/L en Nauplios de *A. franciscana* a 24 h de exposición. Sin embargo, al comparar con los resultados obtenidos por Velasco (2016) el cual también trabajó con Nauplios II de *A. franciscana* existen diferencias considerables ya que su valor

obtenido de la CL_{50} fue entre 0.5 y 0.25 mg/L a 48 h. La diferencia puede deberse al tiempo de exposición, así como a las concentraciones utilizadas en cada ensayo y una gran diversidad de respuestas a distintos niveles de organización biológica, que van desde alteraciones bioquímicas y moleculares, hasta disfunción endocrina, modificaciones conductuales y fisiológicas (efectos sobre crecimiento, reproducción) y de los parámetros poblacionales (Rand y Petrocelli, 1985).

En cuanto al cobre son pocos los datos que existen en organismos de agua marina, entre estos se encuentra el estudio realizado por Cordero, et al. (2005) los cuales establecen una CL_{50} de 6.44 mg/L para Microalga tropical *Tetraselmis chuii*, esta concentración es menor que para *A. franciscana* esta sensibilidad debido a la diferencia del organismo ya que el primero es un zooplancton y el segundo un fitoplancton. Mientras que Somsiri (1983) estudio el efecto en el pez *Tilapia nilotica* Linn obteniendo una CL_{50} a 24 h de 73.40 mg/L, con base a su concentración *Tilapia nilotica* resulta ser más resistente a cobre. Al comparar los valores de estos estudios se puede observar que la especie más sensible fue la Microalga, después *A. franciscana* y por último el pez *Tilapia*. En el caso de los vertebrados marinos, los datos sobre la CL_{50} (96 h) cubren un amplio rango de valores desde 0.1 mg/L para *Pseudopleuronectes americanus* (US. EPA, 1985), 20 mg/L para *Fundulus heteroclitus* (La Roche, 1974) a 25.00 ± 0.65 mg/L *Tilapia nilotica* (Rai, et al., 2015).

Por otro lado, existen muchos estudios de la toxicidad aguda del cobre en organismos de agua dulce encontrados en la literatura. Karntanut & Pascoe (2002) estudiaron la toxicidad aguda del cobre sobre diferentes especies de *Hydras* (*H. vulgaris* y *H. oligactis*) las CL_{50} a 24 h fueron de 0.140 mg/L y 0.180 mg/L respectivamente, dichos resultados se encuentran dentro del rango reportado de los efectos del cobre sobre los invertebrados marinos los son usualmente en concentraciones de 0.01 y 1.0 mg/L (Taylor, 1979).

En el estudio realizado por De Oliveira-Filho et al. (2004) compararon la toxicidad de diferentes pesticidas a base de cobre sobre el pez cebra *Danio rerio* donde se encontró una CL_{50} de 0.349 mg/L, este organismo al igual que las hidras es más sensible que *A. franciscana*. Para crustáceos de agua dulce se reportó una CL_{50} de 0.380 mg/L para *M. lamarrei* y 1.643 mg/L en *M. dayanum* (Lodhi, et al., 2004).

Zyadah & Abdel-Baky (2000) trabajaron la toxicidad aguda del cobre sobre *Mysis sp camaron*, *M. cephalus* y *T. zillii* (crustáceo y peces respectivamente), encontrando que el crustáceo es más sensible que los peces. En general, los valores de CL_{50} a 24 h de exposición para el cobre en distintos organismos de agua dulce resultan ser menores que los obtenidos en el presente estudio, con la excepción de *Daphnia magna* que fue estudiada por Gaete & Paredes (1996) los cuales encontraron una CL_{50} de 60 mg/L, que al comparar con *A. franciscana* presenta una mayor resistencia, por lo tanto *A. franciscana* es mucho más sensible, estas diferencias de resultados puede deberse a que son especies diferentes y de distinto hábitat (agua dulce y salada).

En la tabla 12 podemos observar una recopilación de las CL_{50} a 24h de exposición del cobre en diferentes organismos acuáticos (hidras, peces, algas y crustáceos) obtenidas de diferentes estudios realizados sobre la toxicidad aguda del cobre.

Tabla 12. CL_{50} del cobre a 24 h de exposición sobre diferentes especies acuáticas.

Concentración (mg/L)	Forma del cobre utilizada	Especies	Referencias
0.140	Cu	<i>H. vulgaris (zurich)</i>	(Karntanut & Pascoe, 2002)
0.180	Cu	<i>H. oligactis</i>	(Karntanut & Pascoe, 2002)

0.349	CuSO ₄	<i>D. rerio</i>	(De Oliveira-Filho, et al., 2004)
0.380	CuSO ₄	<i>M. lamarrei</i>	(Lodhi, et al., 2004)
1.634	CuSO ₄	<i>M. dayanum</i>	(Lodhi, et al., 2004)
3.875	CuSO ₄	Postlarvas de camarón <i>Cryphiops caementarius</i>	(Mendoza-Rodríguez, 2009)
4.86	CuSO ₄	<i>Mysis sp camaron</i>	(Zyadah & Abdel-Baky, 2000)
6.3	CuSO ₄	<i>M. cephalus</i>	(Zyadah & Abdel-Baky, 2000)
6.44	CuSO ₄	Microalga tropical <i>Tetraselmis chuii</i>	(Cordero, et al., 2005)
9.2	CuSO ₄	<i>T. zillii</i>	(Zyadah & Abdel-Baky, 2000)
34.04	CuSO ₄	<i>A. franciscana</i>	
60	Cl ₂ Cu	<i>D. magna</i>	(Gaete & Paredes, 1996)
73.40	Cu	<i>Tilapia nilotica</i> Linn	(Somsiri, 1983)

Como ya se pudo ver el cobre es uno de los metales más estudiados, no obstante, existe muy poca información acerca de su toxicidad en organismos de agua salada, en la mayoría de los estudios que se encuentran en la literatura los bioindicadores son organismos acuáticos de agua dulce y por ende en el que se ha generado una mayor cantidad de información. Páez-Osuna (2005) comenta que existe una variabilidad de los resultados que se encuentran en la literatura, ya que la toxicidad del cobre es atribuida principalmente al ión Cu (II), el cual puede llegar a forma complejos fácilmente con una gran variedad de sustancias que se hallan tanto en aguas limpias y contaminada, también es absorbido con cierta facilidad por

el material suspendido (oxidihidroxilo de hierro y manganeso, minerales arcillosos, materia orgánica, entre otros). Esta propiedad y las dificultades relacionadas con la separación de las especies químicas influyen y tiene que ver con la variabilidad de los resultados.

En este estudio se encontró una CL_{50} para el verde de malaquita de 8.32 mg/L en nauplios de *Artemia franciscana*. No existe gran cantidad de información relativa de la toxicidad aguda del MG sobre organismos acuáticos y los datos disponibles abarcan una importante variedad de especies, dentro de los estudios previos no se encontró datos en *A. franciscana*.

De acuerdo a los organismos de ambiente marino se encuentra *Daphnia magna* crustáceo acuático que presento un valor de CL_{50} a 24 h fue 9.27 mg/L (Iannacone & Alvarino, 2007). M. S. El-Neweshy and M. A. AbouSrag (2011) estudiaron la toxicidad del MG en el pez tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) obtuvieron una CL_{50} a 96 h fue de 0.76 mg/L, los signos clínicos que se obtuvieron fueron en forma de manifestaciones respiratorias que pueden atribuirse a la disminución del epitelio de la superficie de las branquias, la exposición repetida a MG conduce a una hiperplasia del epitelio. Otro bioindicador es *Ictalurus punctatus*, el pez gato americano el cual tuvo una CL_{50} a 96 h de 6.25 mg/L (Poe & Wilson, 1983).

Tabla 13. CL_{50} a 24 h* y 96 h de exposición del verde de malaquita (MG) sobre diferentes organismos acuáticos.

Concentración (mg/L)	Compuesto	Especies	Referencias
0.76	MG	<i>Oreochromis niloticus</i>	(M. S. El-Neweshy and M. A. AbouSrag, 2011)
0.84	MG	<i>Ictalurus punctatus</i>	(Poe & Wilson, 1983)

9.27*	MG	<i>D. magna</i>	(Iannacone & Alvarino, 2007)
8.32*	MG	<i>A. franciscana</i>	

Varios investigadores han estimado los valores de CL_{50} de muchos tintes comerciales como el verde de malaquita en diferentes intervalos de tiempo en peces (Clarke y Anliker, 1980). Se ha sugerido que la toxicidad de los tóxicos individuales para diferentes especies de peces es difícil de comparar porque están influenciados por diversos factores, como la temperatura, el pH, la dureza y el oxígeno disuelto del agua de prueba (Schoettger, 1970; Smith y Heath, 1979; Gluth y Hanke, 1983).

Bills et al. (1977) realizó un estudio detallado sobre los valores de CL_{50} de MG en adultos y de diversas especies de peces y observó los efectos del pH, la temperatura y el tiempo de exposición sobre la toxicidad de este colorante. Su estudio indica que la toxicidad de la MG aumenta con el aumento de la temperatura. Alderman y Polglase (1984) también hicieron observaciones similares. Srivastava et al. (1995) también observaron cambios en los valores de CL_{50} de MG en un pez gato de agua dulce, *Heteropneustes fossilis* en diferentes tiempos de exposición y declararon que la toxicidad aumenta con el tiempo de exposición.

Tabla 14. Toxicidad del cloro en organismos acuáticos (AQUIRE, 1994).

Especies	Duración de las pruebas	CL_{50} mg/L (rango)
<i>Daphnia magna</i> (cladocerans)	24 h	0.076 – 0.16
<i>Daphnia pulex</i> (cladocerans)	24 h	0.005 – 0.1
<i>Artemia franciscana</i>	24 h	0.0046
<i>Nitrocras spinipes</i> (caracol)	48 h	5.3 – 12.8

<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trucha arco iris)	96 h	0.13 – 0.29
<i>Salvelinus fontinalis</i> (trucha de arroyo)	96 h	0.1 – 0.18
<i>Lepomis cyanellus</i> (pez luna verde)	96 h	0.71 – 0.82

En este estudio se encontró una CL_{50} a 24 h para el hipoclorito sódico de 0.0046 mg/L en nauplios de *Artemia franciscana*. No existe gran cantidad de información relativa de la toxicidad aguda del hipoclorito sódico sobre organismos acuáticos y los datos disponibles abarcan una importante variedad de especies, dentro de los estudios previos no se encontró datos en *A. franciscana*. Muchos valores de toxicidad son menores o iguales a 1 mg/L. La Tabla 14, muestra los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad del cloro en ciertas especies acuáticas (Aquire, 1994). Los papilomas de la cavidad oral en peces se han asociado con la exposición a suministros de agua clorada (NTP, 1992). La cloración de bajo nivel (0,05 a 0,15 mg/L) produce cambios significativos en la composición de las especies de las comunidades de fitoplancton marino (US. EPA, 1994).

En general al comparar todos los resultados encontrados en la literatura tanto de compuesto del sulfato de cobre, hipoclorito sódico y el verde de malaquita (tabla 15), se puede afirmar que el hipoclorito sódico presenta mayor toxicidad seguido del sulfato de cobre y por último el verde de malaquita, ya que las concentraciones letales medias del hipoclorito sódico son mucho menores que las de los otros dos compuestos.

Tabla 15. Clasificación propuesta por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) para categorizar a las sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos para toxicidad aguda (CL_{50} en mg/L) en comparación con los resultados obtenidos.

Categoría	Descripción	Resultado
-----------	-------------	-----------

I CL₅₀ ≤ 1 mg/L	sustancias altamente tóxicas para organismos acuáticos	Hipoclorito sódico CL ₅₀ = 0.0046 mg/L
II CL₅₀ >1 - ≤ 10 mg/L	sustancias tóxicas para organismos acuáticos	Verde de malaquita CL ₅₀ = 8.32 mg/L
III CL₅₀ >10 - ≤ 100 mg/L	sustancias peligrosas para el ambiente acuático	Sulfato de cobre CL ₅₀ = 13.74 mg/L
IV CL₅₀ > 100 mg/L	sustancias nocivas para los organismos acuáticos	-----

En cuanto a la mezcla de los compuestos, la protección de los ecosistemas acuáticos se basa en normas ambientales que considera las concentraciones máximas permisibles de las sustancias químicas individualmente. Sin embargo, en la realidad existen mezclas complejas en las que se producen múltiples interacciones entre los constituyentes, en este sentido al combinar dos o más agentes químicos pueden ocurrir interacciones de tipo aditivo, sinérgico y antagónico (Gaete & Paredes, 1996; Gaete & Chávez, 2008).

No obstante, existen pocos estudios que se han centrado en sus efectos combinados en los organismos vivos. Ha habido informes aislados sobre efecto sinérgico o la neutralización de los metales pesados específicos en los sistemas biológicos (Chu & Chow, 2002), por ejemplo, copépodos *Amphiascus tenuiremis* (Hagopian-Schlekat, et al., 2001) y nematodo *C. elegans* (Power & De Pomerai, 1999). Diferentes estudios indican efectos aditivos de metales y compuestos orgánicos cuando se encuentran en forma de mezcla (Warne & Hawker, 1995; Altenburger, et al., 1996; Sharma, et al., 1999).

Los resultados obtenidos de la mezcla de cobre con verde de malaquita al inicio fue fuertemente antagónica pero, a efectos mayores (95%) la respuesta fue sinérgica con la pendiente totalmente pronunciada, mientras que para la mezcla de sulfato de cobre con hipoclorito de sodio la respuesta fue al inicio aditiva pero conforme se incrementa se volvió levemente antagónica con la pendiente no pronunciada. Con respecto al verde de malaquita e hipoclorito de sodio sucede que a efectos bajos se presentó antagonismo, mientras que a efectos máximos la respuesta fue un sinergismo elevado, con su pendiente totalmente pronunciada, estos resultados demuestran claramente, que el mecanismo de interacción entre los estos tres compuestos requiere más investigación ya que no se encontró información suficiente de las mezclas.

Por lo tanto, se destaca la importancia de considerar que la acción conjunta de agentes químicos se debe tomar en cuenta en el desarrollo de criterios de calidad de agua ecotoxicológicamente relevantes, ya que los actuales generalmente los consideran en forma individual (Enserink, et al., 1991; Logan & Wilson, 1995)

9. Conclusión.

Las concentraciones letales medias obtenidas demuestran que los compuestos estudiados son tóxicos para los organismos acuáticos zooplanctónicos, y por ende presenta un peligro para los organismos del primer nivel de la cadena trófica, afectando así a los niveles superiores.

La predicción de los efectos de los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos, precisa de la consideración de la acción conjunta de mezclas de agentes químicos, ya que estos podrían llevar a un efecto antagónico, sinérgico y aditiva, por si solo el compuesto podría estar a las concentraciones permitidas pero tal vez en su mezcla podrían tener alguno de estos efectos causando un mayor daño en su respuesta en mezcla que individual.

10. Recomendación.

El estudio de mezclas nos permitirá la identificación de compuestos con menos riesgos si existe posibilidad del uso de éstos con diferentes compuestos que presentan la misma acción.

11. Bibliografía.

Albert, A., 1979. Selective Toxicology, sixth ed. Chapman & Hall, London.

Albert, 2004. Apoptosis induced by ROS. Recuperado 22 de febrero del 2019 de: <http://www.iqb.es/farmacologia/notas/ato06.htm>.

Alderman, D.J., Polglase, J.L., 1984. A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Trans. Br. Mycol. Soc. 83, 313–318.

Alderman, D.J., Clifton-Hadley, R.S., 1988. Malachite green therapy of proliferative kidney disease in rainbow trout: field trials. Vet. Rec. 122, 103–106.

Alloway, B., & Ayres, D. (1997). Chemical principles of environmental pollution (Second Ed.). New York: CRC Press.

Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., & Grimme, H. L. (1996). Regulations for combined effects of pollutants: Consequences from risk assessment in aquatic toxicology. Food and Chemical Toxicology, 34(11-12), 1155-1157. Doi: 10.1016/S0278-6915(97)00088-4.

América, 31(7), 517-524.-42). México: Plaza y Valdes.

Andersen W.C., Turnipseed S.B. & Roybal J.E. 2006. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. Journal of Agriculture and Food Chemical.54: 4517-4523.

Andreoli, C.V. 1993. The influence of agriculture on water quality. En: Prevention of Water Pollution by Agriculture and Related Activities. Actas de la Consulta de Experto de la FAO, Santiago, Chile, 20-23 de octubre de 1992. Water Report 1. FAO, Roma. págs. 53-65

Aquatic Information Retrieval (AQUIRE). EPA ERL-Duluth's aquatic eco- toxicology data systems. Duluth (MN): U.S. EPA (United States Envi- ronmental Protection Agency); 1994

Asem, A. 2008. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. J. Biol. Res., 9: 113-114.

Azmi, W., Saini, R.K., Banerjee, U.C., 1998. Biodegradation of triphenylmethane dyes. Enzyme Microb. Technol. 22, 185–191.

Barata, C., Hontoria, F., & Amat, F. (1996). Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture: Temperature and strain effects. Aquaculture, 142(3-4), 171-189. Doi: 10.1016/0044-8486(95)01250-8.

Barbin EL. Estudo "in vitro" do efeito da adição de lauril dietileno glicol éter sulfato de sódio nas soluções hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino. [Master's thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo; 1999. 108p. Internet site: http://www.forp.usp.br/restauradora/Teses/Barbin/mestrado_barbin.html.

Barceló, L. D. (2016). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes, 27.

Barreto, J. G., & Peralta, G. A. (2009). Determinación de la concentración letal media (CL₅₀-96) de cobre (Cu) Y Cinc (Zn) Mediante pruebas toxicológicas (Bioensayos), Utilizando Alevinos de oncorhynchus Mykiss (Trucha arco iris). Tesis (Ingeniero Ambiental y Sanitario), Universidad de la Salle Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Bogotá D.C.

Bartolomé-Camacho, M. C. (2007). Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *Artemia franciscana*, 8.

Baudouin, M. F., & Scoppa, P. (1974). Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 12(6), 745-751. <https://doi.org/10.1007/BF01685925>

Bautista, F. Z. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados (Primera ed.). Mérida, Yucatán: UADY.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2006). Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives & Contaminants*, 23(10), 1021-1029. Doi: 10.1080/02652030600778702.

Bergwerff, A., y Scherpenisse, P. 2003. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 7:88, 351-359.

Bhattacharya, U., 1995. Effect of some chemotherapeutants on *Aspergillus flavus* Link ex Link Fish fungal isolates of *Channapunctatus* in vitro. *Environ. Ecol. Kalyani* 13 (4), 965–967.

Bills, T.D., Marking, L.L., Chandler Jr., J.H., 1977. Malachite green: its toxicity to aquatic organisms, persistence and removal with activated carbon. *Investig. Fish Contr.* 75, 6.

Biología de la artemia: <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/> consultado 6 de septiembre del 2018

Bly, J.E., Quiniou, S.M.A., Lawson, L.A., Clem, L.W., 1996. Therapeutic and prophylactic measures for winter saprolegniosis in channel catfish. *Dis. Aquat. Org.* 24 (1), 25– 33.

Borkow, G., & Gabbay, J. (2009). Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Current Chemical Biology*, 3(3), 272-278. <https://doi.org/10.2174/187231309789054887>

Boyd, R. (2010). Heavy Metal Pollutants and Chemical Ecology: Exploring New Frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36(1), 46-58. Doi: 10.1007/s10886-009-9730-5.

Bremner, I. (1998). Manifestations of copper excess. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), 1069S-1073S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.1069S>

Brondeau MT, Falcy M, Jargot S, Miraval S, Protois JC, Reynier M, et al. Eaux et extraits de Javel. Fiche toxicologique N° 157 de l'INRS. Cah Notes Doc-Sécur Hyg Trav 2000; 178:11 – 5.

Bucheli, T.D., Fent, K., 1996. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201 –/268.

Bumpus, J.A., Brock, B.J., 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1143–1150.

Cairns, J., & Dickson, K. (1971). A Simple Method for the Biological Assessment of the Effects of Waste Discharges on Aquatic Bottom-Dwelling Organisms. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 43(5), 755-772.

Campbell, R.E., Lilley, J.H., Taukhid, Panyawachira, V., Kanchanakhan, S., 2001. In vitro screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. *Aquacult. Res.* 32 (3), 223–233.

Carey J., Cook P., Giesy J., Hodson P., Muir D., Owens W., Solomon K. Ecotoxicological risk assessment of the chlorinated organic chemical. SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry): Pensacola, Florida; 1998.

Castro, I. I., & Córdova, M. M. (2003). Investigación de la actividad citotóxica de las fracciones de los extractos de cinco especies vegetales mediante el bioensayo de *Artemia salina*. Tesis (Licenciado en Química y Farmacia), Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.

Cavas, T., Garanko, N. N., & Arkhipchuk, V. V. (2005). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.014>

Chairi, H., Fernández-Díaz, C., Navas, J., Manchado, M., Rebordinos, L., & Blasco, J. (2010). In vivo genotoxicity and stress defences in three flatfish species exposed to CuSO₄. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), 1279-1285. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.028>

Chambel, J., Costa, R., Gomes, M. Mendes, S., Baptista, T. y Pedrosa, Rui. 2014. Hydrogen peroxide, iodine solution and methylene solution highly enhance the hatching rate of freshwater ornamental fish species. *Aquacult Int.* 22:1743-1751.

Chang, C.F., Yang, C.H., Shu, Y.O., Chen, T.I., Shu, M.S., Liao, I.C., 2001. Effects of temperature, salinity and chemical drugs on the in vitro propagation of the *Dinoflagellate parasite, Amylodium ocellatum*. *Asian Fish Soc.* P31.

Chapman, D. (1994). *Water Quality Assessment* (2a Ed.). Nueva York: UNESCO, WHO, UNEP, E and FNSPON.

Chu, K. W., & Chow, K. L. (2002). Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquatic Toxicology*, 61(1-2), 53-64. Doi: 10.1016/S0166-445X (02)00017-6.

Clarke, E.A., Anliker, R., 1980. Organic dyes and pigments. In: Hutzinger, O. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 3(A). Springer-Verlag, Berlin, pp. 181–215.

Copper Development Association. (2008). U.S. EPA Approves Registration of Antimicrobial Copper Alloys. NEW YORK: Copper Development Association. Obtenido de: http://www.copper.org/about/pressreleases/2008/pr2008_Mar_25.html.

Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). Revista de Biología Tropical, 53(3-4), 325-330.

Correa, F., Bückle, R., & De la Rosa, V. (1993). Hibridación en algunas poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). Rev. Biol., 41, 97-101.

Cortes, P., Atria, A. M., Contreras, M., Garland, M. T., Peña, O., & Corsini, G. (2006). Magnetic properties and antibacterial activity of tetranuclear copper complexes bridged by oxo group. Journal of the Chilean Chemical Society, 51(3), 957-960. Doi: 10.4067/S0717-97072006000300005.

Craig, P., Wood, C., & McClelland, G. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 293(5), R1882-R1892. doi:10.1152/ajpregu.00383.2007.

Cultivo de la *Artemia* sp:
<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S04.htm>. Consultado 6 de septiembre del 2018.

De la Lanza-Espino, G. (2000). Criterios generales para la elección de bioindicadores. En G. De la Lanza Espino, S. Pulido Hernández, & J. L. Pérez Carbajal, Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores) (Primera ed., págs. 17.

De Oliveira-Filho, E., Lopes, R., & Paumgarten, F. (2004). Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. Chemosphere, 56(4), 369-374. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.04.026.

Desrosiers, C., Leflaive, J., Eulin, A., & Ten-Hage, L. (2013). Bioindicators in marine waters: Benthic diatoms as a tool to assess water quality from eutrophic to oligotrophic coastal ecosystems. EcologicalDíaz, M. C. B., Buston López, M. C., & Espinosa Ramírez, A. J. (2004). Pruebas de toxicidad acuática: Fundamentos y métodos (Primeraed.). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 4 de Octubre de 2015, de: https://books.google.com.mx/books?id=Dc7XzDR7GJMC&pg=PA76&hl=es&source=gbs_selected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false.

Devi, S. R., & Prasad, M. N. V. (2005). Antioxidant capacity of *Brassica juncea* plants exposed to elevated levels of copper. Russian Journal of Plant Physiology, 52(2), 205-208. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0031-8>

Díaz, M. C. B., Sobrero, M. C., & Pica Granados, Y. (2004a). Aseguramiento y control de calidad de Bioensayos. En G. Castillo Morales, Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas (pág. 126). México: IMTA. Recuperado el 22 de Octubre de 2015, de: <https://books.google.com.mx/books?id=GD7N3154OIC&pg=PA3&dq=ENSAYOS+TOXICOL%C3%93GICOS+Y+M%C3%89TODOS+DE+EVALUACI%C3%93N+DE+CALIDAD+DE+AGUAS+Estandarizaci%C3%B3n,+intercalibraci%C3%B3n,+resultados+y+aplicaciones&hl=es-419&sa=X&ved=0CCUQ6AEwAWoVChMIqry4-OT>.

Diggles, B.K., 2001. A mycosis of juvenile spiny rock lobster, *Jasus edwardsii* caused by *Haliphthoros* sp., and possible methods of chemical control. J. Fish Dis. 24 (2), 99–110.

Ditta, I., Steele, A., Liptrot, C., Tobin, J., Tyler, H., Yates, H., Foster, H. (2008). Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO and TiO₂/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T4. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(1), 127-133. Doi: 10.1007/s00253-008-1411-8.

Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Gehring, T.A., Pu, Y.M., Plakas, S.M., 1998. Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography

atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 12 (21), 1625–1634.

Eissa, A.E., Abdelsalam, M., Tharwat, N. y Zaki, M. 2013. Detección of *Saprolegnia parasitica* in eggs of angelfish *Pterophyllum scalare* (Cuvier-Valenciennes) with a history of decreased hatchability. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 1, 7-14.

Enserink, E. L., Maas-Diepeveen, J. L., & Van Leeuwen, C. J. (1991). Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. Water Research, 25(6), 679- 687. Doi: 10.1016/0043-1354(91)90043-P.

Estrela, C., Estrela, C. R. A., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. Brazilian Dental Journal, 13(2), 113-117. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000200007>

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Jr O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. Braz Dent J 1995;6:85-90.

Faúndez, G., Troncoso, M., Navarrete, P., & Figueroa, G. (2004). Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. BMC Microbiology, 4, 19-25. Doi: 10.1186/1471-2180- 4-19.

Fargašová, A. (2001). Winter Third- to Fourth-Instar Larvae of *Chironomus plumosus* as Bioassay Tools for Assessment of Acute Toxicity of Metals and Their Binary Combinations. Ecotoxicology and Environmental Safety, 48(1), 1-5. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1980>

Fent, K., 1998. Oekotoxikologie. Thieme, Stuttgart.

Foster, F.J., Woodbury, L., 1936. The use of malachite green as a fish fungicide and antiseptic. Prog. Fish Cult. 18, 7–9.

Gaete, H., & Paredes, K. (1996). Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 12(1), 23-28

Gaete, H., & Chávez, C. (2008). Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). Limnética, 27(1), 1-10.

Gaetke, L. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology, 189(1-2), 147-163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)

G. Castillo (ed.). 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp.

Gaillardet, J., Viers, J., & Dupré, B. (2003). Trace Elements in River Waters. (J. I. Drever, Ed.) Treatise on Geochemistry, 5, 225-272. Doi: 10.1016/B0-08-043751-6/05165-3.

Galaris, D., & Evangelou, A. (2002). The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 42(1), 93-103. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00212-8](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00212-8)

Gant, V., Wren, M., Rollins, M., Jeanes, A., Hickok, S., & Hall, T. (2007). Three novel highly charged copper-based biocides: safety and efficacy against healthcare-associated organisms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60(2), 294-299. doi:10.1093/jac/dkm201.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint group of experts on the scientific aspects of marine environmental Protection. 1997. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Red.Stud.GESAMP. 65: 40.

Gerundo, N., Alderman, D.J., Clifton-Hadely, R.S., Feist, S.W., 1991. Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study. J. Fish Dis. 14, 521–532.

Glanville S. D., Clark A. G. (1997): Inhibition of human glutathione S-transferases by basic triphenylmethane dyes. Life Sciences, 60, 1535–1544.

Gluth, G., Hanke, W., 1983. The effects of temperature on physiological changes in carp, *Cyprinus carpio* (L.) induced by phenol. Ecotoxicol. Environ. Safety 7, 373–389.

Grant D.C., Papoutsoglou C. & Saroglia Q. 2001. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. Journal of Applied Ichthyology.17: 173-180.

Grossman LI, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agent. J Amer Dent Ass 1941; 28:223-225.

Goldacre, R. J., & Phillips, J. N. (1949). 370. The ionization of basic triphenylmethane dyes. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1724. <https://doi.org/10.1039/jr9490001724>

Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G. T., & Shaw, T. J. (2001). Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. Marine Environmental Research, 51(3), 247-264. Doi: 10.1016/S0141-1136(00)00102-1.

Handy, R. D. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 135(1), 25-38. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00018-7)

Hecht, T., Endemann, F., 1998. The impact of parasites, infections and disease on the development of aquaculture in sub-Saharan Africa. J. Appl. Ichth. 14 (3–4), 213–221.

Henderson, A.L., Schmitt, T.C., Heinze, T.M., Cerniglia, C.E., 1997. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4099–4101.

Hernando M.D., De Vettori S., Martinez B.M.J. & Fernandez A.A.R. 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*.8: (In press).

Huang, W., Hong, C., Zhaohui, H., Zhemchang, L., Guifang, W., Jianying, Z., 1996. Studies of fish fusarium. 1. Studies on *Fusarium fusarioides* isolated from *Micropterus salmoides*. *Acta Hydrobiol.* 2 (4), 345–352.

Husak, V. (2015). Copper and copper-containing pesticides metabolism, toxicity and oxidative stress. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 2(1), 38-50. doi:10.15330/jpnu.2.1.38-50.

Hussein, M.M.A., Wada, S., Hatai, K., Yamamoto, A., 1999. Antimicrobial activity of eugenol against some water molds. In: *Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, Philippines.

Jaehnichen, H., 1976. The artificial reproduction of carp. *Z. Binnenfisch.* D.D.R. 23 (10), 304–315.

Jokela JK, Eloma E, Salinoja-Salonen MS. Adsorbable organic halogens (AOX) in drinking water and aquatic environment in Finland. *J Water Supply: Res Technol* 1992; 41:4 – 11.

Karntanut, W., & Pascoe, D. (2002). The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere*, 17(10), 1059-1064. Doi: 10.1016/S0045-6535(02)00050-4

Kouril, J., Hamackova, J., Kozak, P., Reader, J., 1998. Tolerance of tench, *Tinca tinca* (L.) to baths in malachite green and iodine detergent preparations. *Polish Arch. Hydrobiol.* 45 (3), 439–446.

Kumbhar, A., Padhye, S., Saraf, A., Mahajan, H., Chopade, B., & West, D. (1991). Novel broad-spectrum metal-based antifungal agents. *Biology of Metals*, 4(3), 141-143. Doi: 10.1007/BF01141304.

La Roche, G. (1974). Toxic responses in aquatic organisms. En N. I. Sax, Industrial Pollution (págs. 101-107). New York: Van Nostrand Reinhold.

La Torre, A., Talocci, S., Spera, G., & Valori, R. (2007). Control of downy mildew on grapes in organic viticulture. Communications in agricultural and applied biological sciences, 73(2), 169-178.

Leach, W.E. 1819. Entomostraca, Dictionaire des Science Naturelles, 14, pág. 524.

Lee, H. J., Korshavn, K. J., Kochi, A., Derrick, J. S., & Lim, M. H. (2014). Cholesterol and metal ions in Alzheimer's disease. Chem. Soc. Rev., 43(19), 6672-6682. <https://doi.org/10.1039/C4CS00005F>

Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. Annual Review of Physiology, 68(1), 253-278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>

Lilley, J.H., Inglis, V., 1997. Comparative effects of various antibiotics, fungicides and disinfectants on *Aphanomyces invaderis* and other saprolegniaceous fungi. Aquacult. Res. 28 (6), 461–469.

Linnaeus, C. 1758. Systema naturae. Hofniae, 1: 634.

Linton, D. M., & Warner, G. F. (2003). Biological indicators in the Caribbean coastal zone and their role in integrated coastal management. Ocean & Coastal Management, 46(3-4), 261-276. [https://doi.org/10.1016/S0964-5691\(03\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0964-5691(03)00007-3)

Lodhi, H. S., Khan, M. A., Verma, R. S., & Sharma, U. D. (2004). Acute toxicity of copper sulphate to fresh water prawns. Journal of Environmental Biology, 27(3), 585

Logan, D., & Wilson, H. (1995). An ecological risk assessment method for species exposed to contaminant mixtures. Environmental Toxicology and Chemistry, 14(2), 351-359. doi:10.1002/etc.5620140222.

Luza, S. C., & Speisky, H. C. (1996). Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5), 812S-820S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.812>

Madden, D. (2009). Stephen P. Tomkins¹ and Leighton Dann² For the Wellcome Trust, 5(1), 22.

Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., & Morin, B. (2012). Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Pollution Bulletin*, 64(12), 2663-2670. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.009

Main, W., Ross, C., & Bielmyer, G. (2010). Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2), 216-221. doi:10.1016/j.cbpc.2009.10.008.

Mallatt, J. (1985). Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630-648. <https://doi.org/10.1139/f85-083>

Malpica, A. S., Castro, T. B., Sandoval, H. T., Castro, J. M., De Lara, R. A., & Castro Mejía, G. (2004). Composición del contenido de ácidos grasos en tres poblaciones mexicanas de *Artemia franciscana* de aguas epicontinentales. *Revista de Biología Tropical*, 52(1), 297-300.

Martin, J.W. & G.E. Davis. 2001. An updated classification of the Recent Crustacea. *Nat. Hist. Mus. Los Angeles County. Sci. Ser.*, 39: 1-124.

Mayer F.P., Jorgenson T.A. (1983): Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112, 818–824.

Mazon, A. F., Cerqueira, C. C. C., & Fernandes, M. N. (2002a). Gill Cellular Changes Induced by Copper Exposure in the South American Tropical Freshwater Fish

Prochilodus scrofa. Environmental Research, 88(1), 52-63.
<https://doi.org/10.1006/enrs.2001.4315>

Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., fernandes, M.N. (2002b). Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. Environ. Res. A 88: 52-63. Subasinghe, R., Soto, D., y Jia, J. 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. Reviews in Aquaculture, 1.

Michaels, G. B., & Lewis, D. L. (1986). Microbial transformation rates of AZO and triphenylmethane dyes. Environmental Toxicology and Chemistry, 5(2), 161-166.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620050206>

Molnar K. 1995. Effect of exposure to malachite green solution on common carp fry *Dactylogyrus vastator* (Monogenea) infection. Acta Veterinaria Hungarica .43: 277-286.

Mulligan, A., Wilson, M., & Knowles, J. (2003). The effect of increasing copper content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. Biomaterials, 24(10), 1797-1807. Doi: 10.1016/S0142-9612(02)00577-X.

Mumcuoglu, K., Gabbay, J., & Borkow, G. (2008). Copper oxide-impregnated fabrics for the control of house dust mites. International Journal of Pest Management, 54(3), 235-240. Doi: 10.1080/09670870802010856.

M. S. El-Neweshy and M. A. Abou Srag. Chronic malachite green toxicity in Nile tilapia: Pathological and hematological studies with special reference to quantitative histopathological assessment. Researcher. 2011; 3(4):55-64]. (ISSN: 1553-9865). <http://www.sciencepub.net>.

National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of chlorinated water (CAS NOS 7782-50-5 and 7681-52-9) and chloraminated water (CAS No. 10599-90-3) (Deionized and charcoal- filtered) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). U.S. Dept. of Health and Human Services, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, NTP TR 392; 1992.

NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos

NORMA MEXICANA NMX-AA-110-1995-SCFI, Análisis de agua – evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* kellogg (crustacea – anostraca) – método de prueba.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

Nowell, L. H., Norman, J. E., Moran, P. W., Martin, J. D., & Stone, W. W. (2014). Pesticide Toxicity Index—A tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to freshwater aquatic organisms. *Science of The Total Environment*, 476-477, 144-157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.088>.

Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2008). European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.034>

Ollikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V.M., Glumoff, T., Raijola, T., Suominen, I., 1993. Decolourisation of azo, tri- phenylmethane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4010–4016.

Ortaz, M., González, E., & Peñaherrera, C. (2006). Depredación de peces sobre el zooplancton en tres embalses neotropicales con distintos estados tróficos. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de Schoettger, R.A.*, 1970. Toxicology of thiodan in several fish and aquatic invertebrates. US Department of Interior Fish and Wildlife Series Report 35, p. 31.

Páez-Osuna, F., & Frías-Espericueta, M. G. (2001). Bioacumulación, distribución y efectos de los metales pesados en los peneidos. En F. Páez-Osuna, Camaronicultura y Medio Ambiente (págs. 245-269). México, D.F.: UNAM, El Colegio de Sinaloa.

Páez-Osuna, F. (2005). Efectos de los Metales. En A. V. Botello, J. Rendón von Osten, G. Gold-Bouchot, & C. Agraz-Hernández, Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias (Segunda ed., págs. 343-360). México: Univ. Autón. de Campeche, Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. Indicators, 32. doi:10.1016/j.ecolind.2013.02.021.

Pecora JD, Sousa-Neto MD, Estrela C. Soluções irrigadoras auxiliares do preparo do canal radicular. In: Endodontia - Princípios biológicos e mecânicos. Estrela C, Figueiredo JAP. Eds. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p 552-569.

Petter FA., Segate D., Pacheco L.P, Almeida FA. y F Alcántara Neto 2012. Incompatibilidade física de misturas entre herbicidas e inseticidas. Planta Daninha, Vico- sa- MG, Vol. 30(2):449-457 p. <http://www.scielo.br/paf/pd/v30n2/v30n2a25.paf> [Verificación: noviembre 2015].

Poe, W. E., & Wilson, R. P. (1983). Absorption of Malachite Green by Channel Catfish. The Progressive Fish-Culturist, 45(4), 228-229. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)45\[228: AOMGBC\] 2.0.CO; 2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)45[228: AOMGBC] 2.0.CO; 2)

Pointing, S. B., & Vrijmoed, L. L. P. (2000). [No Title]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16(3), 317-318. <https://doi.org/10.1023/A:1008959600680>

Power, R. S., & De Pomerai, D. I. (1999). Effect of Single and Paired Metal Inputs in Soil on a Stress-Inducible Transgenic Nematode. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 37(4), 503-511. Doi: 10.1007/s002449900545.

Qureshi, T.A., Chauhan, R., Prasad, Y., Mastan, S.A., 1998. Effects of certain drugs on pathogenic fungi isolated from EUS affected fishes. J. Ecotoxicol. Environ. Mont. 8 (1), 2–15.

Ragad, F., & Shoukry, N. M. (2006). Influence of certain fertilizers on the activity of some molluscicides against *Biomphalaria alexandrina* and *Lymnaea natalensis* snails. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 36(3), 959-977.

Rai, A. N., Ullah, A., & Haider, J. (2015). Determination of Acute Toxicity of Copper and Cobalt for *Tilapia nilotica*. *Journal of Bioresource Management*, 2(1), 16- 25.

Rand, G.M., & Petrocelli, S.R. (1987). *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. United States.

Rintamaki-Kinnunen, P., Valtonen, E.T., 1997. Epizootiology of protozoans in farmed salmonids at northern latitudes. *Int. J. Parasitol.* 27 (1), 89–99.

Rintamaki K.P., Rahkonen M., Mykra H. & Valtonen E.T. 2005. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. II. Earth ponds at salmonid farms. *Disease of Aquatic Organisms*. 66: 15-20

Ruiz Pérez, O. (2008). Caracterización de diversas poblaciones de *Artemia* desde el punto de vista de su composición de ácidos grasos y de sus patrones moleculares. *Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València, Departament de Biologia I Antropologia Física, València*.

Ronco, A., & Díaz, M. C. B. (2004). Interpretación y manejo de resultados. En G. Castillo Morales, *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua* (págs. 146-147). México: IMTA.

Salinoja-Salonen MS, Jokela JK. Measurement of organic halogen compounds in urine as an indicator of exposure. *Scand J Workplace Environ Health* 1991; 17:75 – 8.

Sánchez-Fortún R., S., & Barahona Gomariz, V. (2002). *Riesgo toxicológico medioambiental de compuestos activos utilizados para la desinfección de torres de refrigeración*. Madrid: Editorial Complutense.

Santos TC. Estudo “in vitro” do efeito do aumento da temperatura nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores

à dissolução do tecido pulpar bovino. [Master's thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo; 1999. 108p. Internet site: http://www.forp.usp.br/restauradora/Teses/Tanit/tanit_mestrado.html.

Scelzo, M. A. (1997). Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Investigaciones Marinas, 25. <https://doi.org/10.4067/S0717-71781997002500013>

SEGOB. (2010). NMX-AA-087-SCFI-2010, Análisis de agua-Evaluación de Toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea -Cladocera) Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-087-SCFI-1995). NORMA, Secretaria de Economía, México D.F. Recuperado el 16 de octubre de 2015

Serrano, R., Barreda, M., Pitarch, E., & Hernández, F. (2003). Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science, 26(1-2), 75-86. <https://doi.org/10.1002/jssc.200390018>

Schlösser, D. 1756. Extrait d'une lettre de M. le Docteur Schlosser concernant un insecte peu connu. Observation periodique sur la physique, l'histoire naturelle et les beaux-arts, de Gautier, pp. 58-60.

Schmahl G., Ruider S., Mehlhorn H., Schmidt H. & Ritter G. 1992. Treatment of fish parasites. 9. Effects of a medicated food containing malachite green on Ichthyophthirius multifiliis Fouquet 1876 (Hymenostomatida, Ciliophora) in an ornamental fish. Parasitology Research. 78: 183-192.

Schultz, T. P., Nicholas, D. D., & Preston, A. F. (2007). A brief review of the past, present and future of wood preservation. Pest Management Science, 63(8), 784-788. doi:10.1002/ps.1386.

Sharma, S., Schat, H., Vooijs, R., & Van Heerwaarden, L. (1999). Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: Concentration- dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*.

Environmental Toxicology and Chemistry, 18(2), 348-355.
doi:10.1002/etc.5620180235.

Silveira C.R., Prieto T.A. & Ascencio V.F. 2004. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. Comparative Biochemical and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology. 139: 245-250.

Skogerboe, Gaylord V. Law, James P. (1972). Research needs for irrigation return flow quality control. Office of Research and Monitoring. United States Environmental Protection Agency.

Smith, M.J., Heath, A.G., 1979. Acute toxicity of copper, chromate, zinc and cyanide to freshwater fish: effects of different temperature. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 22, 113– 119.

Somsiri, C. (1983). Acute toxicity of mercury, copper and zinc to the *Nile tilapia* (*Tilapia nilotica* Linn). Warasan Kan Pramong, 35(3), 313-318.

Sorgeloos, P. L. (1986). Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Prepared for the Belgian Administration for Development Cooperation. The Food and Agricultural Organization of the United Nations. Gante, Bélgica,

Spanó JCE, Barbin EL, Santos TC, Guimarães LF, Pécora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. Braz Dent J 2001; 12:154-157
Srivastava, S., Sinha, R. y Roy. D. 2004. Toxicological effects of malachite Green. Aquatic Toxicology. 66: 319-329.

Srivastava, S.J., Singh, N.D., Srivastava, A.K., Sinha, R., 1995. Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, *Heteropneustes fossilis*. Aquat. Toxicol. 31, 241–247.

Srivastava, S., Sinha, R., & Roy, D. (2004). Toxicological effects of malachite green. Aquatic Toxicology, 66(3), 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008>

Stephen P. Tomkins and Leighton Dann For the Wellcome Trust (2009).

Straus, D.L. 2003. The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settled pond water. *Aquaculture* 219: 233-240.

Solís, L. M., & López, J. A. (2003). Principios básicos de contaminación ambiental (Primera ed.). Toluca, México: UAEM.

Taylor, D. (1979). A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. Part. Copper. Brixham Lab.

Triantaphyllidis, G., Pouloupoulou, K., Abatzopoulos, T., Pinto Pérez, C., & Sorgeloos, P. (1995). International study on *Artemia* XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia*, 302(3), 215-227. Doi: 10.1007/BF00032111.

US. EPA, E. P. (1985). Ambient water quality criteria for copper-1984. Washington, D. C.: U. S. Govt. Print. Office.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Drinking water criteria document for chlorine, hypochlorous acid and hypochlorite ion. Environmental Criteria and Assessment Office. Cincinnati (OH): U.S. EPA; 1989.

US EPA, E. P. (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms (4 Ed.). Washington, D.C.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Chemical summary for chlorine. Office of pollution prevention and toxics. Cincinnati (OH): U.S. EPA; 1994a. EPA 749-F-94-010a.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Chemical summary for chlorine. Office of pollution prevention and toxics. Cincinnati (OH): U.S. EPA; 1994b. EPA 749-F-94-010a.

US EPA, E. P. (1994c). Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms (2 ed.). Cincinnati.

US EPA, E. P. (2009). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Coppers. Washington, D.C.

Valia, V.M., Fabian, B.L., 1998. Saprolegniales control by acetic acid, sodium chloride and malachite green in eggs of rainbow trout. Boletín Micológico 13 (1–2), 29–34.

Van de Riet J.M., Murphy C.J., Pearse J.N., Potter R.A. & Burns B.G. 2005. Determination of malachite green and leucomalachite green in a variety of aquaculture products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. Journal of AOAC International. 88: 744-749.

Velasco Martínez, J. A. (29 de abril de 2016). Estandarización del bioensayo con *Artemia franciscana*, (Flössner, 1972) y el efecto ecotoxicológico del Sulfato de cobre (II) pentahidratado. Recuperado el 5 de Mayo de 2016, de http://www.academia.edu/7611718/Estandarizaci%C3%B3n_del_bioensayo_con_Artemia_franciscana_Fl%C3%B6ssner_1972_y_el_efecto_ecotoxicol%C3%B3gico_del_Sulfato_de_cobre_II_pentahidratado

Verde de malaquita: <http://spanish.mosinterchem.com/products/Malaquita-verde-CAS-569-64-2-CI-42000-CI-Basic-Verde-4-CI-Basic-Verde-4-8CI-malaquita-verde-B%C3%A1sico-Verde-4-1641392.html>. Consultado 6 de septiembre del 2018.

Visviki, I., & Rachlin, J. W. (1991). The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 20(2), 271-275. <https://doi.org/10.1007/BF01055915>.

Warne, M., & Hawker, D. W. (1995). The Number of Components in a Mixture Determines Whether Synergistic and Antagonistic or Additive Toxicity Predominate: The Funnel Hypothesis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 31(1), 23-28. doi:10.1006/eesa.1995.1039.

Weber, D. J., & Rutala, W. A. (2001). Use of Metals as Microbicides in Preventing Infections in Healthcare. En S. S. Block (Ed.), Disinfection, Sterilization, and Preservation (págs. 415-416). New York: Lippincott Williams & Wilkins.

Weaver, L., Michels, H., & Keevil, C. (2008). Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. *Journal of Hospital Infection*, 68(2), 145-151. doi:10.1016/j.jhin.2007.11.011.

Werth, G., Boiteaux, A., 1967. The toxicity of the triphenylmethane dyestuff malachite green, as an uncoupler of oxidative phosphorylation in vivo and in vitro. *Arch. fur. Toxicol.* 23, 82–103.

Williams, W., & Geddes, M. (1881). Anostracans of Australan Salt Lake, with particular reference to a comparison of *Parartemia* and *Artemia*. En R. Browne, P. Sorgeloos, & C. Trotman, *Artemia Biology* (págs. 351-368). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Willoughby, L.G., Roberts, R.J., 1992. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *J. Fish Dis.* 15 (1), 1–13.

Zatcoff, R. C., Smith, M. S., & Borkow, G. (2008). Treatment of tinea pedis with socks containing copper-oxide impregnated fibers. *The Foot*, 18(3), 136-141. doi:10.1016/j.foot.2008.03.005.

Zidan, Z., Ragad, F., & Mohamed, K. (2004). Molluscicidal activities of certain pesticide and their mixtures against *Biomphalaria alexandrina*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32(1), 285-296.

Zilberg D. & Tamar S. 2006. Optimization and validation of a colorimetric assay for *Tetrahymena* sp. survival. *Research in Microbiology*.157: 355-35.

Zyadah, M. A., & Abdel-Baky, T. E. (2000). Toxicity and Bioaccumulation of Copper, Zinc, and Cadmium in Some Aquatic Organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(5), 740-747. Doi: 10.1007/s001280000066

