



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**

**“VALORACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO AGUDO DE TRES
COLORANTES DE IMPORTANCIA EN ACUICULTURA SOBRE
NAUPLIOS DE *Artemia franciscana*”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGA

PRESENTADA POR:

ALONDRA AELIE CORTÉS TÉLLEZ

DIRIGIDA POR:

D.C. MA. CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO

MORELIA, MICHOACÁN, Noviembre 2012



DEDICATORIA

Dedicada a esas preciosas personas, las cuales me ayudan a seguir adelante y no desistir de mis sueños y metas, estas personas son el mejor regalo que la vida puede hacerme, porque son mi razón y mi optimismo hacia la vida, que junto con ellos logramos una de las tantas metas que me he propuesto en la vida...

A mis preciosos papitos, a mis queridos hermanitos Alain, Gina, Liz Irazú, se las dedico desde lo más profundo de mi corazón, porque fue un logro para ustedes mi hermosa familia...

Dios los bendiga hoy y siempre muchísimo... LOS AMO!!!

AGRADECIMIENTOS

Tengo a tantas personas tan bellas y tan buenas que agradecerles, no me alcanzaría un libro completo para expresar ese sentimiento tan bonito...

Mis queridos papitos MUCHAS GRACIAS de verdad por estar siempre a mi lado guiándome, apoyándome, iluminándome desde sus corazones invaluable, no tengo palabras para expresarme, es una gratitud tan enorme que les debo el universo entero son mi joya...

Mi Querido hermanito Alain gracias por apoyarme tanto gordo, mi querida cuñis Liz gracias por tan valiosos consejos...

Mi cara Gina hermanita gracias en especial a ti porque me alientas a seguir adelante, a ser optimista siempre y sonreír en los peores momentos, por tus consejos y jalones de orejas, por estar a mi lado dios te bendecirá mucho siempre...

Irazu sorellina muchas gracias por estar siempre a mi lado aguantándome, por tus consejos y de no desistir, y ayudarme siempre...

A esos ángeles que se fueron al cielo pero que en sueños me abrazaron y me dijeron todo estará bien...

A mis buenos amigos que me apoyaron tanto emocionalmente muchas gracias...

A mis sinodales muchísimas gracias por esos consejos para mejorar mi trabajo...

Y un GRACIAS ENORME a usted Dra. Carmen le doy gracias a Dios por ponerla en mi camino, MUCHAS GRACIAS por tan bellas oportunidades, paciencia, consejos, apoyo, sinceramente Muchas gracias desde mi corazón, que más puedo expresarle, por ayudarme a lograr este gran paso que doy, que DIOS LA BENDIGA DE VERDAD MUCHÍSIMO...

Muchas Gracias bellas personas que hicieron posible construir esta
meta

Dios los bendiga y los quiero!!!!!!

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS..... i

RESUMEN..... ii

ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 EVALUACIÓN DE RIESGOS AMBIENTALES.....	8
1.2 ANTECEDENTES.....	12-13
1.2.1 Acuicultura.....	13
1.2.2 Características generales de la acuicultura.....	14
1.2.3 Clasificación de los productos químicos utilizados en Acuicultura.....	18
1.2.4 Productos químicos asociados a materiales de construcción de sistemas de cultivo y su mantenimiento.....	21
1.2.5 Sustancias relacionadas con la zootecnia.....	22
1.2.6 Terapéuticos.....	24
1.3 COLORANTES.....	25-26
1.3.1 Impacto ecológico de colorantes.....	27
1.3.2 Legislación.....	28
1.3.3 Generalidades de los colorantes.....	30
1.3.4 Clasificación de colorantes.....	32
1.3.5 Colorantes derivados de Acridina.....	35
1.3.6 Colorantes derivados de Tiazina.....	39
1.3.7 Colorantes derivados del Trifenilmetano.....	44
1.4 BIOINDICADORES Y Artemia franciscana.....	50
1.4.1 Bioensayos.....	51

1.4.2	Bioindicadores.....	55
1.4.3	Biología y Ecología de la Artemia.....	58
1.4.4	Morfología y ciclo de vida de la Artemia.....	59
1.4.5	Artemia franciscana.....	64
2.	HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	68
3.	OBJETIVO	
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	70-71
3.1.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	70
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
4.1	Agua marina sintética.....	73
4.1.1	Organismo de prueba.....	73
4.1.2	Obtención de los nauplios de A. franciscana.....	73
4.1.3	Colorantes orgánicos.....	74
4.1.4	Determinación de la toxicidad aguda del Azul de metileno, Clorhidrato de Acriflavina y Oxalato Verde de Malaquita en nauplios de Artemia franciscana.....	76
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78-79
6.	RESULTADOS.....	80-81
6.1	Clorhidrato de Acriflavina.....	81
6.1.2	Azul de Metileno.....	88
6.1.3	Oxalato de Verde de Malaquita.....	93
7.	DISCUSIÓN.....	105-106
7.1	Clorhidrato de Acriflavina.....	107

7.1.2 Azul de Metileno.....	108
7.1.3 Oxalato de Verde de Malaquita.....	109
8. CONCLUSIONES.....	112-113
9. RECOMENDACIONES.....	115-116
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Terapéuticos más utilizados en la acuicultura.....	4
Tabla 2. Fármacos utilizados en la terapéutica de enfermedades en el sector acuicultura.....	5
Tabla 3. Clasificación de productos químicos usados en Acuicultura a nivel mundial (GESAMP, 1997; Douet et., al., 2009).....	19
Tabla 4. Parámetros establecidos para industrias de pigmentos y colorantes NOM-065-ECOL-1994.....	28
Tabla 5. Parámetros establecidos para el sector acuicultura en aguas dulces NOM-089-ECOL-1994.....	29
Tabla 6. Parámetros establecidos para el sector acuicultura en aguas salobres o marinas NOM-089-ECOL-1994.....	29
Tabla 7. Radiación absorbida y color observado.....	31
Tabla 8. Clasificación de acuerdo a estructura química (Lillie, 1977).....	33
Tabla 9. Propiedades físico-químicas del Clorhidrato de Acriflavina.....	36
Tabla 10. Propiedades Físico-Químicas	

del Azul de Metileno.....39

Tabla 11. Propiedades Físico-Químicas

del Oxalato de Verde Malaquita.....46

Tabla 12. Criterios para la selección de bioensayos en laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas (Rámirez & Mendoza, 2008).....53

Tabla 13. Parámetros seguidos para una óptima eclosión de nauplios de *Artemia franciscana*.....74

Tabla 14. Colorantes y concentraciones empleadas.....75

Tabla 15. Valores de LC₅₀ A 24h del Clorhidrato de Acriflavina y sus límites de confianza 95%.....81

Tabla 16. Valores de LC₅₀ a 48h de exposición de Clorhidrato de Acriflavina y límites de confianza del 95%.....83

Tabla 17. Valores de LC₅₀ del Clorhidrato de Acriflavina y límites de confianza del 95% sobre nauplios de *Artemia franciscana*.....85

Tabla 18. Valores de LC₅₀ del Azul de Metileno a 24h con sus respectivos límites de confianza del 95%.....88

Tabla 19. Valores de LC₅₀ a 48h de exposición del Azul de Metileno y límites de confianza del 95%.....89

Tabla 20. Valores de LC₅₀ a 72H del Azul de Metileno y límites de confianza del 95%.....91

Tabla 21. Valores de LC₅₀ a 24H del Oxalato de Verde de Malaquita y límites de confianza del 95% sobre nauplios de *Artemia franciscana*....93

Tabla 22. Valores de LC₅₀ del Oxalato de Verde Malaquita a 48H y respectivos LC95%.....95

Tabla 23. Valores de LC ₅₀ a 72H del Oxalato de Verde Malaquita y límites de confianza del 95%.....	97
--	----

Tabla 24. Valores de Concentración Letal 50 (CL ₅₀), con sus correspondientes Límites de Confianza al 95 % (LC 95 %), obtenidos para cada uno de los compuestos colorantes ensayados, sobre larvas de <i>Artemia franciscana</i> de 24-, 48- y 72 horas de vida.....	100
--	-----

ÍNDICE DE GRÁFICOS, FIGURAS Y DIAGRAMAS

Figura 1. Transiciones electrónicas inducidas por la absorción de energía.....	32
Figura 2. Estructura del Clorhidrato de Acriflavina.....	36
Figura 3. Mecanismo de mutación por inserción o delección de nucleótidos por acridinas.....	38
Figura 4. Estructura del Azul de Metileno.....	39
Figura 5. Mecanismo de inducción de apoptosis celular por Azul de Metileno	42
Figura 6. Mecanismo de acción del Azul de Metileno en la vía del Óxido Nítrico.....	43
Figura 7. Estructura del Oxalato de Verde de Malaquita.....	46
Figura 8. Mecanismo del metabolismo de Verde de Malaquita en ratones y sus efectos.....	48
Figura 9. Características morfológicas de <i>Artemia</i>	60
Figura 10. Nauplios de <i>Artemia</i> ; (A) cara dorsal y (B) cara ventral.....	61

Figura 11. Sistema circulatorio y digestivo de <i>Artemia</i>	62
Figura 12. Diferencias morfológicas entre macho y hembra de <i>Artemia</i>	63
Figura 13. Ciclo de vida de <i>Artemia franciscana</i>	64
Diagrama 1. Preparación del agua de mar sintética para el cultivo de <i>Artemia franciscana</i>	73
Diagrama 2. Metodología de los ensayos de toxicidad para la obtención de LC ₅₀ a 24, 48 y 72h de los 3 colorantes empleados.....	77
Gráfico 1. Curva Concentración-Respuesta del Clorhidrato de Acriflavina a 24h de exposición en nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	82
Gráfico 2. Análisis Probit del Clorhidrato de Acriflavina a 24h....	83
Gráfico 3. Curva de Concentración-Respuesta del Clorhidrato de Acriflavina a 48h de exposición en nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	84
Gráfico 4. Análisis Probit a 48H de exposición del Clorhidrato de Acriflavina.....	85
Gráfico 5. Curva de Concentración-Respuesta a 72H del Clorhidrato de Acriflavina.....	86
Gráfico 6. Análisis Probit a 72H del Clorhidrato de Acriflavina....	87
Gráfico 7. Curva Concentración-Respuesta del Azul de Metileno a 24H de exposición en nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	88
Gráfico 8. Análisis Probit del Azul de Metileno a 24H de exposición.....	89
Gráfico 9. Curva Concentración-Respuesta a 48h del Azul de Metileno.....	90
Gráfico 10. Análisis Probit del Azul de Metileno a 48H.....	91

Gráfico 11. Curva Concentración-Respuesta	
a 72h del Azul de Metileno.....	92
Gráfico 12. Análisis Probit del Azul de Metileno a 72H.....	93
Gráfico 13. Curva Concentración-Respuesta del Oxalato de Verde Malaquita	
a 24h de exposición en nauplios de Artemia franciscana.....	94
Gráfico 14. Análisis Probit del Oxalato	
de Verde Malaquita a 24H.....	95
Gráfico 15. Curva Concentración-Respuesta del Oxalato de Verde Malaquita	
a 48h de exposición en naulios de Artemia franciscana.....	96
Gráfico 16. Análisis Probit del Oxalato de Verde Malaquita a 48h de	
exposición.....	97
Gráfico 17. Relación Concentración-Efecto del Oxalato de Verde Malaquita a	
72H de exposición sobre nauplios de Artemia franciscana.....	98
Gráfico 18. Análisis Probit del Oxalato de	
Verde Malaquita a 72H.....	99
Gráfico 19. Comparación de Curvas Concentración-Respuesta a 24H del	
Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno	
y Oxalato de Verde Malaquita.....	101
Gráfico 20. Comparación de Curvas Concentración-Respuesta a 48H del	
Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno	
y Oxalato de Verde Malaquita.....	102
Gráfico 21. Comparación de Curvas de Concentración-Respuesta a 72H del	
Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno	
y Oxalato de Verde Malaquita.....	103

ABREVIATURAS

EGF: Receptor Factor de crecimiento epidérmico

EPA: Environmental Protection Agency

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Food and Drug Administration

GESAMP: The Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection

LC₅₀: Concentración Letal 50%

MB: Methylene Blue

MG: Malachite Green

NAS: Academia Nacional de Ciencias

NRC: Consejo Nacional de Investigación

NTP: Programa Nacional de Toxicología

ROS: Reactive Oxygen Species

TPO: Tiroperoxidasa

TSH: Tirotropina

WHO: World Health Organization

RESUMEN

El manejo de una gran variedad de sustancias químicas en el tratamiento de enfermedades ocasionadas por ectoparásitos en el sector acuicultura, cuando son vertidas a los medios acuáticos en altas concentraciones, generan efectos tóxicos en organismos no objetivo; estas sustancias químicas actualmente no han sido

específicamente evaluados desde el punto de vista de sus efectos sobre el medio ambiente acuático. En este estudio se evaluó el efecto toxicológico agudo sobre nauplios de *Artemia franciscana* a 24, 48 y 72h de exposición, que se deriva de la presencia de los colorantes Azul de Metileno, Clorhidrato de Acriflavina y Oxalato de Verde de Malaquita los cuales son usados en el tratamiento de infecciones fúngicas y protozoarias en el cultivo de peces.

Se obtuvieron CL_{50} a 72h de exposición de cada uno de los colorantes ensayados y se determinó que el colorante que presentó mayor toxicidad a una concentración menor fue el Oxalato de Verde de Malaquita el cual mostró una LC_{50} de 0.000223mg/l, seguido en respuesta de mortalidad por el Clorhidrato de Acriflavina con una LC_{50} de 0.01406mg/l y por último al Azul de Metileno LC_{50} de 0.3241mg/l, a mayor tiempo de exposición se necesita de menor concentración para que cada colorante presente una mayor respuesta de letalidad. Además *Artemia franciscana* presentó mayor sensibilidad a las 72h de exposición de cada xenobiótico tratado.

El estudio de letalidad en cada uno de los compuestos activos ensayados revela que, tanto el oxalato de verde de malaquita como el azul de metileno y el clorhidrato de acriflavina se comportan como elementos altamente tóxicos para los nauplios de *Artemia*, microcrustáceo perteneciente al zooplancton y por tanto representante de los primeros niveles tróficos.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, Azul de Metileno, Clorhidrato de Acriflavina, Oxalato de Verde de Malaquita, Acuicultura, Ecotoxicología

ABSTRACT

The management of a variety of chemicals in the treatment of diseases caused by ectoparasites in the aquaculture industry, when discharged to aquatic environments in high concentrations, generate toxic effects on non-target organisms, these chemicals are currently not specifically evaluated from the point of view of its effects

on the aquatic environment. This study evaluated the acute toxicological effects on *Artemia franciscana* nauplii at 24, 48 and 72 h of exposure, which is derived from the presence of methylene blue dye, acriflavine hydrochloride and malachite green oxalate which are used in treatment of fungal and protozoal infections in fish farming.

LC₅₀ were obtained 72h exposure to each of the dyes tested and determined that the colorant greater toxicity at a lower concentration was Malachite Green oxalate which showed an LC₅₀ of 0.000223mg/l, followed in response mortality by acriflavine hydrochloride with an LC₅₀ of 0.01406mg/l finally Methylene Blue 0.3241mg/l LC₅₀, a longer exposure time is needed to lower concentration for each dye present greater lethality response. Also presented *Artemia franciscana* 72h increased sensitivity to xenobiotic exposure of each treaty.

The lethality bioassay each of the active compounds tested reveals that both the malachite green oxalate as methylene blue and acriflavine hydrochloride elements behave as highly toxic to the *Artemia* nauplii, microcrustacean belonging to the zooplankton and as representative of the first trophic levels.

Keywords: *Artemia franciscana*, methylene blue, acriflavine hydrochloride, Malachite Green Oxalate, Aquaculture, Ecotoxicology

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso de sustancias peligrosas se ha extendido y va en constante aumento, ya no sólo en la industria, sino también en los diversos sectores sociales, lo cual se ha traducido en riesgos sanitarios y ambientales importantes, ya que de las más de cien mil sustancias químicas que se encuentran en el comercio mundial, aproximadamente dos mil reúnen alguna de las características de peligrosidad (Semarnat, 2006).

La acuicultura ha sido fuertemente criticada, por lo agresiva que resulta al medio ambiente ya que provoca destrucción de manglares, empleo de antibióticos que propician el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos de uso humano, destrucción del ecosistema por el vertimiento de residuales tóxicos, sin embargo la industria acuícola ha aumentado de forma sostenida, pero la producción de las especies más importantes en términos económicos ha demostrado altas y bajas atribuibles a varias causas, entre las que las enfermedades constituyen la causa principal. (Moriarty, 2001; Harper 2002)

Los motivos del uso de drogas de uso veterinario, en especies acuáticas incluyen la necesidad de:

- Tratamiento y prevención de enfermedades
- Controlar parásitos tanto internos como externos
- Aumentar la producción y el crecimiento de especies acuáticas
- Anestesia (p.ej.: durante el traslado)

La mayoría de estos productos químicos no han sido específicamente evaluados a nivel acuático, representando un alto riesgo de contaminación en los cuerpos de agua donde se aplican (presentándose un mayor riesgo en estuarios y en áreas cercanas a la costa) y también originando efectos adversos en los organismos destinatarios y no destinatarios de dichos productos químicos como puede ser en el caso de los antimicrobianos ya que estos ocasionan:

- Aumento de la resistencia bacteriana en patógenos que afectan al ser humano.
- Acumulación de residuos tóxicos de antimicrobianos en peces como consecuencia de la alimentación durante largos períodos.

- Conduce a la hipersensibilización en la salud humana por el uso de antibióticos que son potentes alérgenos.
- Promueve el desarrollo de resistencia adquirida en las bacterias entéricas del ser humano (Auró, 1996).

En general, estas sustancias químicas son productos muy estables con tendencia a acumularse en los tejidos de los organismos acuáticos originando alto impacto en la salud humana, cuando los residuos de los fármacos son potencialmente transferidos a la cadena alimenticia humana (Smith *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2001).

Algunos de estos productos veterinarios se utilizan en concentraciones bajas, pero en la mayoría de los casos, no se tiene información sobre la acción que ejercen estas sustancias en las especies no objetivo y, en general, ante la respuesta biológica que aparecerá sobre la estructura y funcionamiento de los ecosistemas expuestos (Soto & Norambuena 2004; Buschmann *et al.*, 2006; León-Muñoz *et al.*, 2007; Costa-Pierce *et al.*, 2008; Burridge *et al.*, 2008).

La evaluación de los riesgos asociados con los productos químicos acuícolas se complica por la falta de datos cuantitativos sobre su uso. La mayoría de los países, (entre ellos México) no tienen datos sobre las cantidades de productos químicos utilizados en la acuicultura, además se carece de información sobre el terreno útil para cuantificar el riesgo, tales como las concentraciones de efluentes de productos químicos y de la naturaleza. Los fabricantes de productos químicos no divulgan esta información y, en muchos casos, puede incluso no saberse el uso final de sus productos.

Los datos relevantes de acuerdo a la GESAMP (1997), son particularmente limitados para las zonas tropicales. La eficacia, el metabolismo, y el destino de estos productos al medio ambiente han sido adquiridos por medio de estudios en condiciones templadas. Esta información puede, o no, ser aplicable en las latitudes más bajas, donde la temperatura, las características del suelo y los atributos peculiares de cada especie son diferentes a las realizadas en las condiciones templadas.

Entre dichos productos químicos utilizados en acuicultura, se tienen varios fármacos veterinarios terapéuticos con actividad antibacteriana, fungicida, antiparasitaria y anestésica, siendo los más usados en peces.

Con respecto a las drogas cuyo uso se ha prohibido en especies de consumo, es importante indicar que entre los factores que han determinado su prohibición destaca la alta residualidad del fármaco o sus metabolitos, efectos indeseables como mutagénesis o carcinogénesis, así como la contaminación acuática generada por colorantes, los cuales impiden que los rayos solares penetren y por consecuencia se inhibe la fotosíntesis, así como la reducción crítica del oxígeno, y por lo que puede dar lugar a muerte tanto a organismos objetivo como no objetivo.

Los fármacos a los que se les hace un mayor seguimiento para ser detectados por uso ilegal son: cloranfenicol, nitrofuranos, furazolidona, quinolonas y fluoroquinolonas, verde de malaquita, azul de metileno, benzocaína, quinaldina y acriflavina (González, 2011). En las siguientes tablas (1 y 2), se muestran los terapéuticos más utilizados en la acuicultura:

Tabla 1. Terapéuticos más utilizados en la acuicultura

Principio activo	Dinamarca	Francia	Alemania	Grecia	Italia	Reino Unido
Amoxicilina						Sí
Clortetraciclina			Sí		Sí	
Flumequine		Sí			Sí	
Ac. Oxolínico	Sí	Sí				Sí
Oxitetraciclina		Sí	Sí	Sí		Sí
Sarafloxacin						Sí
Sulfamerazina	Sí				Sí	
Tetraciclina					Sí	
Trimetopim +Sulfamida	Sí		Sí	Sí		Sí
Azametifos						Sí
Peróxido de hidrógeno						Sí
Yodóforos		Sí				
Amonios cuaternarios		Sí				

Tabla 2. Fármacos utilizados en la terapéutica de enfermedades en el sector acuicultura

Enfermedad	Grupo Terapéutico	Principio activo	LMR en peces o Salmónidos	LMR en otras especies	Medicamento para peces
Forunculosis	Penicilinas	Ampicilina	SI	SI	NO
		Amoxicilina	SI	SI	NO
	Quinolonas	Sarafloxacin	SI	SI	NO
		Enrofloxacin	SI	SI	NO
		Flumequine	SI	SI	NO
		Acido Oxolinico	SI	SI	NO
		Difloxacin	SI	SI	NO
	Tetraciclinas	Oxitetraciclina	SI	SI	NO
		Tetraciclina	SI	SI	NO
	Sulfamidas	Trimetoprim	SI	SI	NO
Boca Roja	Quinolonas	Flumequine	SI	SI	NO
		Acido Oxolinico	SI	SI	NO
		Sarafloxacin	SI	SI	NO
	Tetraciclinas	Oxitetraciclina	SI	SI	NO
	Sulfamidas	Trimetoprim	SI	SI	NO
BKD	Penicilinas	Bencilpenicilina	SI	SI	NO
	Quinolonas	Enrofloxacin	SI	SI	NO
	Sulfamidas	Trimetoprim	SI	SI	NO
	Macrólidos	Eritromicina	SI	SI	NO
Estreptococias	Tetraciclinas	Oxitetraciclina	SI	SI	NO
		Tetraciclina	SI	SI	NO
	Macrólidos	Eritromicina	SI	SI	NO
		Josamicina	NO	SI	NO
Vibriosis	Quinolonas	Flumequine	SI	SI	NO
		Acido Oxolinico	SI	SI	NO
		Sarfloxacin	SI	SI	NO
	Sulfamidas	Trimetoprim	SI	SI	NO
	Aminoglucósidos	Kanamicina	NO	SI	NO
Mixobacterias	Penicilinas	Amoxicilina	SI	SI	NO
	Quinolonas	Acido Oxolinico	SI	SI	NO
	Tetraciclinas	Tetraciclina	SI	SI	NO
		Oxitetraciclina	SI	SI	NO
	Sulfamidas	Trimetoprim	SI	SI	NO
Micobacterias	Aminoglucosidos	Kanamicina	NO	SI	NO
		Estreptomycin	NO	SI	NO
	Sulfamidas	Trimetoprim	SI	SI	NO
Edwardsiella	Tetraciclinas	Oxitetraciclina	SI	SI	NO
<i>Acinetobacter</i> y septicemias hemorrágicas	Aminoglucósidos	Kanamicina	NO	SI	NO
		Estreptomycin	NO	SI	NO
	Quinolonas	Acido Oxolinico	SI	SI	NO
	Tetraciclinas	Oxitetraciclina	SI	SI	NO
	Sulfamidas	Trimetoprim	SI	SI	NO
Parásitos	Antiparasitarios	Cipermetrina	SI		NO
		Deltametrina	SI		NO
		Emamectina	SI		NO
		Teflubenzuron	SI		NO
Antisépticos y desinfectantes	Sales de cobre	Sulfato de cobre	SI	SI	NO
	Amonio cuaternario	Cloruro amónico	SI	SI	NO
		Lauril sulfato amónico	SI	SI	NO
	Yodóforos	Yoduro	SI	SI	NO
Anestésicos	Anestésicos locales	Benzocaina	SI	SI	NO

En la tabla 2, se enlistan las posibilidades en la terapéutica de enfermedades en el sector acuícola, como se puede apreciar ningún fármaco es especialmente diseñado para manejarse en peces u otros organismos acuáticos, lo que conlleva a

una mala utilización de estos productos, por ejemplo, la administración errónea de la dosis/concentración, eficacia, el potencial de efectos adversos, los posibles efectos sobre organismos no objetivo, el riesgo de resistencia microbiana y la tasa de eliminación de residuos químicos de los fármacos utilizados.

Es por eso, que se pretende evaluar el efecto toxicológico agudo de fármacos que no están autorizados por la EPA para su uso en organismos acuáticos sobre aguas salobres (estuarios y manglares principalmente), y establecer concentraciones a las cuales presentan riesgos en organismos o especies no objetivos, en este contexto, se maneja al microcrustáceo *Artemia franciscana*.

1.1 EVALUACIÓN DE RIESGOS

Evaluación de riesgos ambientales

Numerosas sustancias y productos químicos entran en el ambiente acuático como el resultado de las diversas actividades antropogénicas y pueden ocasionar impactos adversos para la salud humana y en el medio ambiente en que son descargadas. Dada la abundancia de estos compuestos y la gran cantidad de sus efectos adversos potenciales, es necesario contar con una metodología que permita evaluar de una manera cuantitativa y cualitativamente los riesgos a dichos contaminantes, así como la mención de los peligros potenciales.

Para conocer la magnitud de estos efectos adversos existe un proceso denominado “Evaluación de riesgos”, que se define como: proceso sistemático para estimar los riesgos que están relacionados con sustancias, productos y procesos peligrosos sobre el medio ambiente y en la salud humana tras su aplicación o emisión.

Dicha metodología consta de tres etapas:

- a. El proceso de evaluación de riesgos
- b. El manejo de los riesgos que implica la identificación, evaluación, selección y la implementación de acciones para reducir el riesgo para la salud (Peña & Gómez, 2004)
- c. La comunicación de riesgos de manera que sea comprensible e inequívoca a todos los que puedan ser afectados por los riesgos

Se puede considerar que hay un riesgo cuando existe:

- Fuente de riesgo, proceso o actividad que introduce al ambiente un agente de riesgo.
- Proceso de exposición, mediante el cual la población entra en contacto con el contaminante que ha sido emitido por la fuente.
- Un proceso causal, con la cual la exposición puede generar consecuencias negativas para la salud humana y en el ambiente.

Se define “riesgo” como la probabilidad de que ocurra un efecto adverso ya sea a nivel individual o poblacional, por la exposición a una concentración o dosis específicas de un contaminante químico peligroso. Esto involucra la posibilidad de

que existan efectos negativos en la salud humana y en el medio ambiente, y la incertidumbre respecto a la aparición, magnitud y duración de estos efectos.

El modelo para llevar a cabo el proceso de evaluación de riesgo ha sido descrito por la Academia Nacional de Ciencias (NAS) y el Consejo Nacional de Investigación (NRC). Este modelo consta de cinco fases:

- I. *Identificación de peligro*: que permite evaluar la peligrosidad potencial de una sustancia o producto químico. Esto incluye la recolección y la evaluación de información sobre el tipo y las condiciones de exposición en que se manifiestan los daños en la salud producidos por la sustancia en cuestión. Esto requiere la caracterización del comportamiento de un contaminante específico dentro del cuerpo humano y sus interacciones con células o partes de ellas y en órganos.
- II. La información necesaria en esta etapa se obtiene a partir de los estudios realizados con las diferentes pruebas que determinan las propiedades físico-químicas, propiedades toxicológicas tanto en animales de experimentación como en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Peña & Gómez, 2004); lo cual permite la clasificación y etiquetado de las sustancias y, en la toma de decisiones y priorización sobre las sustancias que deben continuar o no el proceso de evaluación medio ambiental y de riesgos a la salud humana (Torres *et al.*, 2004).
- III. *Evaluación Dosis-Respuesta*: describe la asociación entre la exposición y el efecto en la salud, así que, ante niveles diferentes de exposición a una sustancia peligrosa, la severidad de los efectos en la salud cambia (Anglés, 2006). Se estima a partir de experimentos realizados mediante la administración de dosis o concentraciones de las sustancias a los animales de laboratorio (Baird, 2001). Los animales son expuestos altas dosis y los efectos de la exposición a bajas dosis deben predecirse con aspectos teóricos acerca de la forma de la curva en las relaciones dosis-respuestas.

Para efectos en los que existe alteraciones en el material genético, incluyendo la iniciación de cáncer, existen bases teóricas para afirmar que los efectos ocurren a dosis bajas. Para los otros efectos biológicos, usualmente se parte del supuesto de que existe un nivel de umbral, por la cual se dice los

animales de ensayo no están afectados (Baird, 2001). Las sustancias que muestran umbral, la relación dosis-respuesta consiste en describir las respuestas observadas con el objetivo de establecer una concentración de una sustancia en el cual no se observan efectos de ningún tipo, a este nivel se le conoce como NOEL (Nivel de efectos no observables). Sustancias que no presentan umbral, se considera que los agentes carcinogénicos no tienen un nivel de umbral, se supone que la curva dosis-respuesta sólo llega a riesgo cero cuando la dosis es cero y que a medida que aumenta la dosis, el riesgo, de inmediato se vuelve infinito.

Normalmente, la toxicidad de una sustancia aumenta al amplificar la dosis. Los individuos difieren significativamente en su susceptibilidad a un compuesto químico dado, algunos responden a dosis bajas, mientras que otros necesitan dosis más altas antes de que reaccionen (Baird, 2001).

- I. *Evaluación de la exposición en humanos*: estimación del cálculo de la dosis de individuos que están expuestos a determinado agente peligroso ambiental, así como de la magnitud, duración y la frecuencia de la exposición.

Algunos de los factores que controlan la exposición son:

- Factores que controlan la producción del agente en cuestión y su ingreso al ambiente
- La cantidad y la localización en el ambiente del compuesto que fue liberado
- Características que controlan el destino ambiental del contaminante, incluyendo su transporte, la persistencia y la degradación
- Factores que determinan el contacto de los humanos con el agente en cuestión y los mecanismos de absorción de la sustancia.

- II. *Caracterización del riesgo*: se analiza la información obtenida en los pasos anteriores y se prepara para su presentación de manera útil y comprensible, especificando las limitaciones de los supuestos de los que se partió y de las incertidumbres cuantitativas y cualitativas que hayan surgido a lo largo de todo el proceso.
- III. *Estimación de la exposición*: el término “exposición” lo define la EPA como “el contacto con un agente químico o físico” y especifica que su magnitud está

determinada por las mediciones de la cantidad de dosis (concentración) del agente que se encuentra en el medio ambiente y éste entre en contacto con el cuerpo humano.

Las principales fuentes de exposición a los que se está en contacto con los contaminantes pueden ser a través del aire, agua, alimentos, suelo, etc, en concentraciones en las que pueden variar; por lo que para determinar estas concentraciones se necesitan de mediciones sistemáticas del contaminante en los diferentes destinos ambientales.

Muchos productos farmacéuticos aplicados con propósitos medicinales o como aditivos pueden llegar finalmente al ambiente acuático por rutas directas o indirectas. Entre dichos compuestos destacan varios fármacos veterinarios que pueden ser usados como antifúngicos y antiparasitarios en acuicultura. Sin embargo, no se conocen las consecuencias ecológicas del ingreso de estas sustancias a la columna de agua. Por ende, la evaluación del efecto de estos compuestos en organismos acuáticos no destinatarios, como el anostraca *Artemia franciscana*, a través de una evaluación del riesgo ecológico permitirá tomar las medidas de mitigación necesarias para la protección de los ambientes acuáticos por productos farmacéuticos.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 ACUICULTURA

“Los Estados deberían promover prácticas acuícolas responsables, con el fin de apoyar a las comunidades rurales, las organizaciones de productores y los acuicultores.”*DEPOSITOS DE DOCUMENTOS DE LA FAO (Artículo 9.4.1 del CCPR).*

Dado la importante expansión y el aumento de la producción y del valor de las actividades acuícolas y otras afines, generalmente se cree que la acuicultura y la pesca basada en el cultivo ofrecen grandes posibilidades para atender la creciente demanda de alimentos. De hecho, la acuicultura se concentra en países en desarrollo, particularmente en los países asiáticos. El grueso de la producción acuícola se basa en sistemas que utilizan escasos insumos (Pillay *et al.*, 1992, 1996; Pullin *et al.*, 1993). Las exportaciones de especies de gran valor permiten obtener divisas en muchos países en desarrollo. Además, y lo que es muy importante para la seguridad alimentaria, la producción, elaboración y venta de pescado ofrece posibilidades de mejorar la nutrición en las zonas rurales y urbanas, puesto que ofrece una fuente económicamente accesible de proteínas de alta calidad además de brindar una oportunidad para generar ingresos, al mismo tiempo que se diversifica la producción y se reducen los riesgos de depender exclusivamente de la producción de uno o varios tipos de productos.

Al hablar de recursos hidrológicos se incluyen las aguas interiores o continentales como ríos y lagos, y las oceánicas que abarcan al medio marino y costero. Ambos son susceptibles de contaminación debido a la gran cantidad de residuos químicos, físicos y biológicos que se vierten de manera directa o indirectamente en los cuerpos de agua debido a distintas actividades antropogénicas. En México, en cuanto a los usos que se le dan al agua, el mayor volumen se destina al riego agrícola (83%), a las poblaciones (12%), industrias (3%) y a la acuicultura (2%). En este contexto, la acuicultura, al igual que otras actividades económicas, usa y transforma los recursos en productos con valor económico y social. Al hacerlo produce desechos, que finalmente tienen un alto impacto ecológico, incluso económico y social. (Buschmann, 2001).

1.2.2 Características generales de Acuicultura

La acuicultura es una de las actividades productivas en más rápida expansión en el mundo. La palabra acuicultura viene del latín: *aqua*: agua y *cultura*: cultivo (RAE, 2001); y se define como “el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, la producción, crecimiento y comercialización de organismos de aguas dulces, salobres o saladas, lo cual implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar producción, en operaciones como la siembra, la alimentación y la protección de depredadores, etc.” (FAO, 2007).

En términos generales, la acuicultura se divide de acuerdo a las siguientes características (Cifuentes *et al.*, 1997):

- **Según las fases del ciclo biológico**, desde el punto de vista de la acuicultura, el ciclo biológico de cualquier especie, consta de las siguientes fases: reproducción y producción de huevos; fase de larva y post-larva o alevín; fase juvenil y adulto.
 - **1.ª Etapa:** Engloba las fases de reproducción y producción de larvas y post-larvas o alevines.
 - **2.ª Etapa:** Abarca desde la fase de post-larva o alevín, hasta la consecución de individuos con talla comercial. Es la etapa denominada comúnmente de engorde, que esencialmente consiste en cultivar el producto que proviene de los criaderos o que es recogido del medio natural con pequeño tamaño, engordándolo hasta que alcanza el tamaño comercial.
- **De acuerdo al manejo de las especies de organismos:**
 - **Semicultivo:** es aquél donde la especie es manejada sólo durante una parte de su ciclo de vida.
 - **Cultivo:** cuando la especie en producción es manejada y controlada durante todo su ciclo de vida, desde la producción del huevo y el desarrollo embrionario hasta la etapa adulta y su reproducción.

- **De acuerdo a los métodos para desarrollar a las especies que se están cultivando pueden ser:**
 - **Circuito cerrado**, que consiste en que el técnico tiene un control sobre los organismos desde el huevo hasta el momento de su comercialización;
 - **Circuito abierto**, en el cual las crías se recolectan del medio natural para llevarlas a la granja comercial para su engorda y crecimiento.
- **Según el número de especies que se cultivan en un mismo cuerpo de agua, se puede denominar:**
 - **Monocultivo**: en el que sólo se maneja una especie, puede recibir el nombre del grupo biológico al que pertenezca éste, así por ejemplo, al cultivo de peces se le llama *piscicultura*.
 - **Policultivo**: se utilizan varias especies que habitan diferentes estratos del cuerpo de agua, con distintos hábitos alimentarios, evitando la competencia por el alimento y se aprovechan los diferentes niveles tróficos del sistema acuático.
- **Considerando el grado de explotación al que están sujetos los organismos cultivados, así como el cuerpo de agua en que viven, la acuicultura puede ser:**
 - **Acuicultura extensiva**, es la que se realiza en áreas de aguas naturales continentales y protegidas del país, con poco o ningún cambio en el ambiente, alcanzando una producción cuyo límite está dado por la capacidad del medio. Para desarrollarla, es necesario contar con unidades de producción de crías, las cuales son sembradas en los cuerpos de agua apropiados para cada especie, donde aprovechan el alimento natural, creciendo y engordando. En estos cuerpos de agua naturales existen otras especies que pueden ser competidoras o depredadoras de las sembradas.
 - **Acuicultura intensiva**, es aquella en la que, además de alcanzar rendimientos mayores de lo que la capacidad del medio natural permite, se ejerce un alto grado de control y manejo del agua y de los organismos,

mediante técnicas y sistemas especializados, con el objetivo de alcanzar el máximo rendimiento de acuerdo con los recursos económicos del productor. Tiene que estar continuamente apoyada por investigaciones multidisciplinarias que tengan como meta el incremento de la producción, con base en las características biológicas de la especie.

- ***Acuicultura semi-intensiva***, se desarrolla en diferentes instalaciones tales como estanques y cuerpos de agua como bordos temporales o permanentes, represas, canales de riego y otras. Se caracteriza por la falta de control que ejerce el acuicultor sobre el ambiente, quien sólo interviene en los aspectos alimenticio y reproductivo. Se sitúa de acuerdo con las fuentes alimenticias que en este caso son promovidas por la fertilización orgánica o inorgánica, aunque también se puede adicionar alimento con la intención de completar la dieta con productos vegetales o de otro tipo con menos del 10% de contenido proteico.
- ***Según el tipo de aguas donde se realicen los programas de acuicultura, ésta puede dividirse en dos grandes ramas:***
 - ***Acuicultura continental***, los recursos naturales que intervienen se identifican dentro de un marco ecológico constituido principalmente por el suelo, el agua y las especies. El suelo es utilizado como un sustrato para establecer un cuerpo de agua. Aunque es posible que al agua se le agreguen directa o indirectamente fertilizantes, como desechos y otras sustancias alimenticias, el suelo es el principal determinante de la productividad del agua, ya que a partir de él se incorporan al agua sales minerales que permiten que el fitoplancton elabore la materia orgánica y así se inicia la cadena alimenticia. Una forma simple e indirecta de la acuicultura continental, es el mejoramiento del hábitat, lo que debe entenderse como el control que el hombre puede ejercer sobre algunas características del lugar, como en las zonas de protección y desove, disponibilidad de alimento natural mediante fertilización, depredación y algunas enfermedades parasitarias. Estos procedimientos se aplican, generalmente, en cuerpos de agua grandes como lagunas y ríos.

- **Acuicultura marina o maricultura**, se montan en las lagunas litorales; en los sistemas en tierra, que incluyen toda clase de estanques, donde se cambia agua durante la marea alta y lugares de la costa en donde la marea tiene influencia y, por lo tanto, se refrescan constantemente; la colocación de jaulas flotantes amarradas cerca de la costa; jaulas a media agua y jaulas en el fondo del mar. En el sistema de jaulas, se seleccionan zonas abrigadas, ya sea natural o artificialmente, para la protección de los organismos que se están cultivando y para los servicios diarios de mantenimiento.

En México, las estadísticas de producción en acuicultura disponibles corresponden al año 2011 (SAGARPA, 2011) con un volumen de 261,811 toneladas. Esta actividad puede ocasionar impactos negativos en el ecosistema acuático en forma directa e indirecta. Cuando no se tratan las aguas de desecho de la acuicultura se contribuye a la contaminación directa de las fuentes de agua donde se vierten, debido a la carga de materia orgánica y nutrientes presentes en el alimento que no fue consumido y en las heces de los organismos cultivados. (Naylor *et al.*, 2001; EEA, 2003; EPA, 2003), a lo cual se suma la descarga de contaminantes originados por otras actividades como las industriales, agropecuarias y domésticas. Las aguas de desecho de la acuicultura contienen además, residuos de aditivos químicos, patógenos y terapéuticos como lo son antibióticos y otras sustancias utilizadas para el tratamiento en enfermedades externas ocasionadas por ectoparásitos en los organismos que se cultivan (**Ej. Verde de malaquita, Azul de Metileno y Acriflavina**). Esto ocasiona eutrofización de las aguas, acidificación, turbidez, reducción del oxígeno disuelto, cambios en la temperatura del agua, etc. (EEA, 2003; EPA, 2003).

Los productos químicos son un componente esencial para el éxito de la acuicultura, y se han utilizado en diversas formas durante siglos (Subasinghe *et al.*, 1996). A medida que la acuicultura se ha expandido, ha adoptado los productos químicos desarrollados originalmente para su uso en otros sectores industriales, especialmente el sector agrícola. (GESAMP, 1997). En consecuencia muchos productos químicos actualmente en uso común en la

acuicultura no han sido específicamente evaluados desde el punto de vista de sus efectos sobre el medio ambiente acuático, en particular en aguas costeras.

1.2.3 Clasificación de los productos químicos utilizados en Acuicultura

En términos generales, los productos químicos que se utilizan en la acuicultura, se agrupan en tres categorías (GESAMP, 1997):

- La primera consiste en productos químicos acuícolas que representan un alto nivel de peligro, su uso debe ser restringido. Esta categoría incluye: cloranfenicol, pesticidas orgánicos con estaño, colorantes fungicidas y antiparasitarios externos y, potencialmente, algunos organofosforados.
- La segunda categoría incluye los productos químicos que se pueden utilizar de forma segura si se siguen las pautas estándar, pero representan una amenaza para el medio ambiente y / o la salud humana si no se utilizan adecuadamente, es decir, una dosis excesiva, falta de una adecuada neutralización o dilución antes de la descarga, o la falta de equipo adecuado de protección personal, etc., son algunos de los factores que podrían hacer que el uso de un producto químico tenga una falta de seguridad aceptable.
- La tercera categoría incluye a aquellos productos químicos que pueden ser ambientalmente benignos en la mayoría de las situaciones, pero perjudicial en sitios específicos, debido a los atributos únicos de esos sitios. La selección adecuada de los sitios de cultivo pueden reducir sustancialmente los impactos ambientales de estos productos químicos acuícolas.

Las sustancias químicas utilizadas en la acuicultura costera pueden también ser clasificadas de acuerdo al uso, es decir, el tipo de organismos que se cultivan, la etapa del ciclo de vida en que se utilizan, el sistema de cultivo y la intensidad del cultivo, etc.

De acuerdo a su uso en acuicultura y a sus efectos adversos en organismos acuáticos no objetivo, se clasifican como se muestra en la tabla siguiente

(GESAMP, 1997; Douet *et al.*, 2009). En la Tabla 3 se enumeran los principales productos químicos utilizados:

Tabla 3. Clasificación de productos químicos usados en Acuicultura a nivel mundial (GESAMP, 1997; Douet *et. al.*, 2009)

MATERIALES ESTRUCTURALES Y SUSTANCIAS PARA EL MANTENIMIENTO	
Productos químicos asociados a materiales de construcción de estanques (estructurales) y en el tratamiento de agua y suelo. Incluye antioxidantes, fungicidas, plastificantes, etc	CaCO₃ Ca(OH)₂ CaO MgCO₃ Sulfato de aluminio Cloro Sulfato de calcio Zeolita
Desinfectantes	Compuestos de amonio cuaternario Compuestos clorados y Cloramina T Iodo Ozono Formaldehído
Pesticidas	Compuestos orgánicos con estaño Tributilestaño Dibutilestaño Amoniaco Saponinas
Herbicidas, Alguicidas	Triazinas: Simazina Compuestos de cobre
SUSTANCIAS RELACIONADAS CON LA ZOOTECNIA	
Fertilizantes	Fosfato de amonio Urea Estiércol

Aditivos alimenticios	Vitaminas	Metales pesados
	Inmunoestimulantes	Pigmentos
	Butilhidroxitolueno	Atrayentes
Metales pesados	Cobre	Cadmio
	Manganeso, etc	
Anestésicos	Benzocaína	Eugenol
	Tricaína	2-fenoxietanol
	Bióxido de Carbono	Metomidato
Hormonas	17α-metiltestosterona, GH, estradiol, etc	
TERAPÉUTICOS		
Agentes antibacterianos	Penicilinas	Fenicoles
	Macrólidos	Quinolonas
	Nitrofuranos	Tetraciclinas
	Sulfonamidas	
Pesticidas	Organofosforados	Organoclorados
	Etilazinfos	Endosulfán
	Azametifos	Lindano
	Fenithrothion	Endrina
	El diazinón	CARBAMATOS
	Clorpirifós	Carbaril
	Triclorfon	PIRETRINAS
	di-n-butilftalato	Avermectina
	Ivermectina	Emamectina
	Peróxido de hidrógeno	

Otros terapéuticos	Compuestos de Cobre	Niclosamida
	Formaldehído	Glutaraldehído
	Permanganato de Potasio	
	Acriflavina	
	Verde de Malaquita	
	Azul de Metileno	
	Dimetridazol	Metronidazol
	Trifluralina	Levamisol

1.2.4 Productos químicos asociados a materiales de construcción de sistemas de cultivo y su mantenimiento

- **Productos químicos asociados a materiales estructurales de construcción y para el tratamiento de aguas y suelos.** Entre los materiales estructurales se encuentran polímeros de cadena larga que generalmente son inertes, pero estos plásticos contienen una gran cantidad de aditivos, entre los cuales se encuentran antioxidantes (fenoles), absorbentes de rayos UV (benzofenoles), estabilizadores (sales de ácidos grasos), pigmentos (cromatos, sulfato de cadmio), plastificantes, fungicidas, desinfectantes, lubricantes, retardantes de fuego (organofosforados), agentes de endurecimiento (como el peróxido) y los antiestáticos. A pesar de que algunos tienen baja solubilidad y en cierto caso, dan un grado de seguridad aceptable, muchos de estos compuestos pueden tener efectos adversos en organismos acuáticos en niveles bajos de exposición. De hecho la mortalidad en acuicultura viene dado por la lixiviación de los aditivos o de las sustancias químicas de los materiales de construcción (estructurales) de los plásticos. Principalmente para el tratamiento de aguas y suelo se utilizan el carbonato de calcio, carbonato de magnesio, óxido de calcio e hidróxido de calcio, en concentraciones de 100-8,000 kg/ha, como floculantes, también para aumentar la alcalinidad de aguas y suelos disminuyendo la

acidez y, dar protección contra plagas y depredadores, reduce la turbidez en estanques. Su toxicidad viene dada por su uso excesivo.

- **Desinfectantes**

En desinfectantes se utiliza compuestos de amonio cuaternario, yodo, ozono, compuestos clorados, etc. Son utilizados en la desinfección de equipos, para el mantenimiento de la higiene en todo el ciclo de producción, y en algunos casos, en tratamiento de enfermedades de los organismos cultivados. Estos compuestos son altamente tóxicos, entre ellos está el hipoclorito cálcico o sódico el cual es utilizado a nivel mundial en la desinfección de tanques y equipamiento. La concentración de ClO^- incrementa cuando el pH decrece. Su componente activo es la clorina o más comúnmente conocido como cloro, el cual es altamente tóxico para los organismos acuáticos. Otro de ellos es el formaldehído (37-40%), también usado en la desinfección de equipos. Es tóxico en organismos acuáticos a bajas concentraciones con una LC_{50} a 96h de 1 a 1000 $\mu\text{l/l}$.

- **Pesticidas**

Entre los pesticidas se encuentran compuestos orgánicos con estaño en su estructura como el tributilestaño (TBT) y el dibutilestaño (DBT). Son sustancias lipofílicas. Se utilizan como alguicidas, y como anti incrustantes (antifouling). El TBT es altamente tóxico para organismos acuáticos y se acumula en el sedimento marino.

1.2.5 Sustancias relacionadas con la zootecnia

- **Fertilizantes**

En cuanto a los fertilizantes, en general no son tóxicos cuando se aplican correctamente, de acuerdo con la estructura y las necesidades del sistema. Sin embargo, presentan toxicidad cuando existe el riesgo de proliferación de algas, la sedimentación excesiva en los estanques, y el amoníaco, alcanzando un nivel alto de toxicidad. El estiércol puede ser contaminado con metales pesados (Boyd, 1999).

- **Aditivos alimenticios**

La administración de Vitaminas A, D, E puede inhibir el crecimiento de rotíferos cuando se administra en concentraciones altas (superior a 0.2, 1 y 2 mg/ml, respectivamente). El butilhidroxitolueno tiene efectos tóxicos cuando se utiliza como un compuesto puro a niveles de exposición excesivamente altos.

- **Metales pesados**

Entre los metales pesados se encuentra el cobre; los compuestos de cobre como el sulfato de cobre, se utilizan como anti-incrustantes (antifouling) ya que inhibe la respiración y la fotosíntesis en las algas, es altamente tóxico en ecosistemas acuáticos, produce radicales libres ocasionando la per-oxidación de las membranas.

- **Anestésicos**

Los agentes anestésicos se han utilizado en la acuicultura para la inmovilización de los animales de cría para la extracción del óvulo y esperma. También son utilizados para sedar a los organismos cultivados durante el transporte. Tienen variables en los márgenes de seguridad y por lo general estrechas (por ejemplo, el índice terapéutico del sulfato de triclaína es 1.3 a 1.5) y la dosis debe adaptarse a la temperatura, la salinidad y a las especies. Debido a que se manejan dosis muy bajas generalmente no presentan riesgos ambientales, pero si para los usuarios, por lo cual su uso es limitado.

- **Hormonas**

Se utilizan para promover el crecimiento, ovulación y el control total del ciclo de vida de muchas especies. Entre las hormonas administradas se encuentra el estrógeno 17 β -estradiol, el cual es un potente promotor de tumores en tejidos hepático y renal, además estimula el crecimiento de la línea de células cancerígenas de próstata en el humano. (Castagnetta y Carruba, 1995).

1.2.6 Terapéuticos

- **Antibióticos**

Las infecciones bacterianas son de las más frecuentes y graves en los sistemas de cultivo intensivo y es allí en donde la mayoría de los antibacterianos se utilizan. Su uso en la acuicultura puede contribuir a aumentar la resistencia bacteriana y causar efectos perjudiciales en la medicina en general. Los antibióticos pueden acumularse en todos los órganos, debido a sus propiedades físicas y farmacodinámicas.

Tienen una marcada influencia en las poblaciones bacterianas, y en consecuencia, puede dañar los filtros biológicos en sistemas de recirculación. Los antibióticos como la enrofloxacin, ampicilina, eritromicina y polimixina B pueden influir en el crecimiento de las poblaciones de bacterias nitrificantes (Nimenya et al., 1999). Además, la mayor parte de estos compuestos termina en el ambiente acuático, a través del alimento no ingerido y en las heces fecales de dichos organismos, los que pueden ser posteriormente consumidos por organismos detritívoros o peces silvestres que se alimentan alrededor de los sistemas de cultivo. Algunos antibióticos solubles se diluyen rápidamente y otros, como la oxitetraciclina, son fotodegradables. Sin embargo, se ha determinado que diferentes antibióticos pueden permanecer durante varios meses en los sedimentos.

- **Otros terapéuticos y antibacterianos**

En el presente trabajo de investigación se enfocará a este tipo de productos químicos utilizados en acuicultura, con especial énfasis en los colorantes sintéticos orgánicos: **Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno y Oxalato de Verde de Malaquita**; estos colorantes se utilizan para el tratamiento externo de enfermedades producidas por protozoarios, hongos y algunas bacterias en el cultivo de peces. Existen países en donde este tipo de compuestos químicos se siguen utilizando sin discriminación por el bajo coste, el fácil acceso, y la eficacia en su actividad antiparasitaria, a pesar del posible riesgo para el consumo humano y la presencia de un alto impacto ecológico.

El vehículo de administración de estos fármacos es a través del agua. Ya que en cultivos por ejemplo intensivos no es posible que puedan ser inyectados. Los peces tienen una epidermis no queratinizada, esto favorece el ingreso de fármacos por vía cutánea, las branquias por su vascularización y ubicación son otra vía importante de ingreso de fármacos (González, 2011). Esta vía de administración tiene efectos potenciales en el ambiente acuático y por ende a organismos no objetivo. Se tiene la reducción en la saturación de oxígeno del agua a la cual se aplica el fármaco (ej. formaldehído como agente reductor) o efectos sobre bacterias nitrificantes encargadas del ciclo del nitrógeno (ej. aplicación de antibióticos o **Azul de Metileno**), y también el bloqueo de la entrada de los rayos solares inhibiendo la fotosíntesis (**Azul de Metileno**) (Reema *et al.*, 2011).

1.3 COLORANTES

COLORANTES

En esta sección, se expondrá el concepto de colorante y sus propiedades generales de los colorantes tricíclicos de acridina, tiazina y trifenilmetano, usos, toxicidad y mecanismo de acción, dosis o concentraciones utilizadas de cada uno de los colorantes utilizados en la presente tesis.

1.3.1 Impacto ecológico de colorantes

Un gran número de colorantes químicamente diferentes también son usados en aplicaciones industriales (papelera, textil, alimenticia, farmacéutica, etc) y una gran proporción aparece como agua de desecho que es derramada en el medio ambiente acuático natural. Los colorantes sintéticos poseen ciertas propiedades, como lo es la resistencia a la abrasión, estabilidad fotolítica, resistencia al ataque químico y bacteriano, lo que hace que se mantengan inalterados por mucho tiempo. Por esta razón, la mayoría de estos compuestos presentan un doble problema ambiental desde el punto de vista estético y toxicológico. Los colorantes contienen grupos cromóforos de alto peso molecular, los cuales al acumularse en ecosistemas acuáticos provocan disminución en la luminosidad de las aguas y en consecuencia inducen a la disminución de la actividad fotosintética, provocando a su vez una baja en el contenido de oxígeno disponible en el agua. También causa fenómenos como la eutrofización, alteraciones de color y olor, al igual que la persistencia. (Bautista 2011; Sires, 2008). Las descargas directas de efluentes que contienen colorantes en el medio ambiente puede causar la formación de productos tóxicos carcinogénicos (Allen & Koumanova, 2003). El deterioro del ecosistema acuático no depende únicamente de las cantidades de los colorantes vertidos, sino de las propiedades ecotoxicológicas de cada producto individualmente y de las características de su transporte en el medio ambiente, ya que algunos colorantes son solubles y otros no lo son, por lo cual su toxicidad y su biodegradabilidad pueden ser variables. (Riva *et al.*, 1988).

1.3.2 Legislación

Las normas oficiales mexicanas NOM-065-ECOL-1994 y NOM-089-ECOL-1994 establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las industrias de pigmentos y colorantes y del sector de acuicultura. Se considera que las descargas de aguas residuales en ríos, cuencas, cauces, aguas marinas y demás depósitos o corrientes de agua, provenientes de las industrias de pigmentos y colorantes y de la actividad acuícola, provocan efectos adversos en los ecosistemas, por lo que es necesario fijar los límites máximos permisibles de contaminantes que deberán satisfacer dichas descargas. En las siguientes Tablas 4, 5 y 6 se muestran los límites máximos permisibles de parámetros establecidos en dichas normas.

Tabla 4. Parámetros establecidos para industrias de pigmentos y colorantes (Fuente: NOM-065-ECOL-1994)

Parámetros	Límites máximos permisibles Promedio diario	Límites máximos permisibles Instantáneo
p H	6-9	6-9
Demanda química de Oxígeno (mg/l)	300	360
Grasas y aceites (mg/l)	40	50
Sólidos sedimentables (ml/l)	1.0	2.0
Sólidos suspendidos totales (mg/l)	200	250

Tabla 5. Parámetros establecidos para el sector acuicultura en aguas dulces (Fuente: NOM-089-ECOL-1994)

Parámetros	Límites máximos permisibles Promedio diario	Límites máximos permisibles Instantáneo
p H	6-9	6-9
Demanda bioquímica de Oxígeno (mg/l)	30	50
Fósforo total (mg/l)	0.2	0.5
Nitrógeno total (mg/l)	2.0	0.5
Sólidos suspendidos totales (mg/l)	35	60

Tabla 6. Parámetros establecidos para el sector acuicultura en aguas salobres o marinas (Fuente: NOM-089-ECOL-1994)

Parámetros	Límites máximos permisibles Promedio diario	Límites máximos permisibles Instantáneo
p H	6-9	6-9
Demanda bioquímica de Oxígeno (mg/l)	35	70
Sólidos suspendidos totales (mg/l)	40	80

Sin embargo no se fijan concentraciones permisibles específicamente de colorantes en su manejo como terapéuticos en el sector de acuicultura, presentando graves problemas de impacto ecológico en los ecosistemas acuáticos.

1.3.3 Generalidades de los colorantes

Un colorante es un compuesto que contiene grupos cromóforos (un grupo con un doble enlace apolar C=C o polares como C=O, N=O-, etc o pares de electrones de no enlace), los cuales son portadores de color, además están integrados en el grupo cromógeno, el cual es el soporte y generador de los grupos **cromóforos**. Existen además, grupos auxiliares llamados **auxócromos**, los cuales acentúan el color del grupo cromóforo; determinan si son colorantes básicos (negativos), ácidos (positivos) o neutros, son por tanto, determinantes para su unión a los tejidos (Ej. Ácidos: -COOH, -OH, -SO₃H, Básicos: -NHR, -NR₂, -NH₂). Los grupos auxocrómicos pueden producir efectos **batocrómicos** o **hipsocrómicos**.

El efecto **batocrómico** consiste en el desplazamiento de la radiación absorbida hacia valores mayores de λ (menor energía) lo que se traduce en un desplazamiento del color hacia la zona azul del espectro visible. Este fenómeno lo producen los grupos que poseen pares de electrones de no enlace (amino, hidroxilo, halógeno, etc.), capaces de extender el sistema conjugado como donadores de electrones. El efecto **hipsocrómico** es justo lo contrario y se traduce en un desplazamiento del color hacia la zona amarilla del espectro visible. Lo producen los grupos que atraen electrones por resonancia (nitro, carboxilo, éster, etc.). Unidos a un anillo de benceno que al aplicarse a un sustrato en disolución o en dispersión, le confiere un color más o menos permanente. El sustrato debe tener afinidad específica para retenerlo.

También se debe considerar el tamaño o peso molecular de la molécula del colorante y su planalidad (capacidad de rotación) ya que de esto dependerá cuan fácil y rápido penetrará un tejido y por lo tanto a cuales componentes celulares se unirá. Tienen la capacidad de absorber o emitir en un rango de luz visible de 400-700nm.

Tabla 7. Radiación absorbida y color observado

Longitud de onda (nm)	Radiación absorbida	Color observado
<400nm	Zona UV (incoloro)	Incoloro
400-430	Violeta	Verde-Amarillo
430-480	Azul	Amarillo
480-490	Verde-Azul	Amarillo-Naranja
490-510	Azul-Verde	Rojo
510-530	Verde	Púrpura
530-570	Amarillo-Verde	Violeta
570-580	Amarillo	Azul
580-600	Naranja	Verde-Azul
600-680	Rojo	Azul-Verde
680-750	Púrpura	Verde
>750nm	Zona IR (incoloro)	Incoloro

El color que presenta una sustancia es realmente el complementario al de la radiación que absorbe, ya que corresponde a la radiación que refleja (Tabla 8). Así, una sustancia que absorbe radiación correspondiente al color azul ($\lambda = 430-480$ nm) tiene color amarillo, mientras que otra que absorbe radiación amarilla, presenta color azul. La percepción del color está asociada con transiciones electrónicas entre el estado fundamental y el estado excitado, es decir, la diferencia de energía entre un nivel energético ocupado por un electrón y otro vacío; una vez que el sistema vuelve al estado fundamental, mediante diversos mecanismos de relajación, se emite energía, que puede ser en forma de radiación como la fluorescencia o el color. (Fig.1):

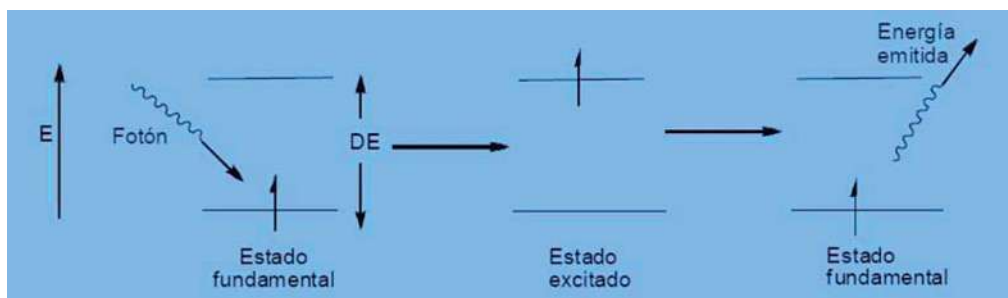


Figura 1. Transiciones electrónicas inducidas por la absorción de energía

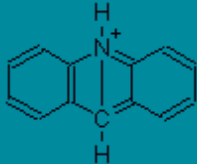
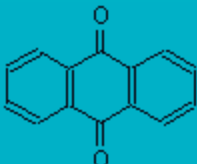
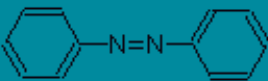
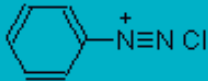
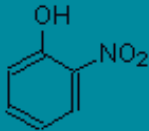
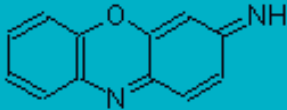
1.3.4 Clasificación de colorantes

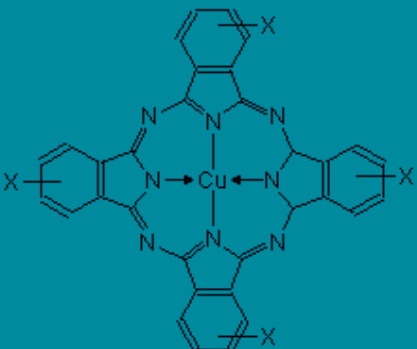
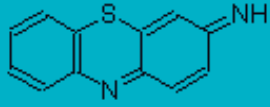
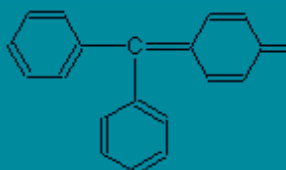
Los colorantes se clasifican de acuerdo a su solubilidad, propiedades colorantes y estructura química:

- De acuerdo a su estructura química los colorantes se clasifican en **orgánicos** e **inorgánicos**. Además ambos se pueden sub-dividir en *naturales* y *sintéticos*.

Clasificación de los colorantes orgánicos sintéticos de acuerdo a su estructura química:

Tabla 8. Clasificación de acuerdo a estructura química (Lillie, 1977)

CLASE	FÓRMULA GENERAL
ACRIDINA	
ANTRAQUINONA	
AZO	
DIAZONIO	
NITRO	
OXAZIN	

FTALOCIANINA	
TIAZINA	
TRIFENILMETANO	

En la presente tesis, se explicarán los colorantes quinoides (Derivados de acridina, derivados de quinona-imina-tiazinas, y derivados de arilmetano-trifenilmetano).

1.3.5 Colorantes derivados de Acridina

Los colorantes de **Acridina** dan colores entre amarillo y anaranjado, se obtienen mediante una condensación de un aldehído con dos moléculas de una base de anilina conteniendo solamente un segundo grupo amino, el cual es el que proporciona el N puente en posición meta con respecto al que produce el color. En general son colorantes básicos debido a su carga positiva en el N del anillo quinoide. Este tipo de colorantes poseen una fuerte acción antiséptica, debido a que, se insertan entre dos bases sucesivas del DNA y las separa físicamente, lo que provoca errores en la duplicación del DNA bacteriano. Tienen actividad sobre bacterias Gram-positivas, y aumentan su actividad en soluciones alcalinas siendo por tanto, productos farmacéuticos de interés. El uso de colorantes derivados de acridina como agentes antiprotozoarios comenzó en 1912 por Ehrlich y Benda, posteriormente como agentes antibacterianos por Carl Browning y su primer uso clínico fue en 1917. Fueron ampliamente utilizados durante la Segunda Guerra Mundial como agentes antipalúdicos. En la década de los 40's fueron desplazados por la aparición de la Penicilina. Sin embargo, surgió la necesidad de utilizar de nuevo este tipo de colorantes, ya que se observaba resistencia bacteriana hacia las penicilinas, además el uso tópico de este tipo de colorantes en presencia de luz aumenta su acción bactericida en bajas dosis. (Wainwright, 2001).

Entre los más conocidos se encuentran la **Acriflavina**, Naranja de acridina, Proflavina.

- **Clorhidrato de Acriflavina**

Colorante fluorescente derivado de la acridina, su nombre de acuerdo a la IUPAC es 3, 6-diamino-10-metilacridinio clorhidrato, conocida comercialmente como Acriflavina ácida o cloruro de Acriflavinio. Es uno de los colorantes más utilizados a nivel mundial en acuicultura pesquera marina y en ornamental. El uso de la acriflavina en acuicultura fue determinado por Elliott & Amend (1978) y se utiliza en los centros de producción de juveniles, como agente profiláctico (Tien songrasmee *et al.*, 1989; Mohamed *et al.*, 2000), y en el tratamiento de enfermedades externas ocasionadas por bacterias y protozoarios y, en la desinfección de huevos de peces. (Meinelt *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 1993; Madsen *et al.*, 2000; Tucker 1998, Álvarez-Lajonchère & Tsuzuki 2008).

Tabla 9. Propiedades físico-químicas del Clorhidrato de Acriflavina

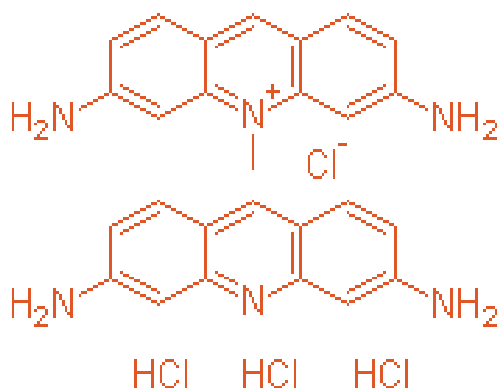


Figura 2. Estructura del Clorhidrato de Acriflavina

PROPIEDADES	
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₂₆ Cl ₂ N ₆
Peso molecular	259.7 g/mol
Apariencia física	Polvo naranja-rojizo
Solubilidad	250-300 g/l (20°C)
Punto de fusión	260°C
Rango de p H (1% de solución)	1.5-2

La acriflavina fue introducida en 1913 y fue el primer miembro de los antisépticos básicos (Sánchez & Sáenz, 2005). Se utiliza como antiséptico de superficie y bacteriostático, como desinfectante de acción lenta contra bacterias Gram-positivas, presenta además, acción antifúngica contra *Saprolegnia spp.*; como antiprotozoario, eficaz contra *Ambiphyra*, *Chilodonella*, *Cryptocaryon irritans*, *Hexamita*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Oodinium* y especies de *Scyphidia* y actividad sobre *Costia* y *Tricodina*; y su actividad al igual que otras acridinas incrementa en soluciones alcalinas. Es administrado en baños a largo plazo de 6-12h con concentraciones de 10-20mg/l.

En veterinaria se usa como desinfectante en heridas de tricomoniasis de mucosa urogenital, principalmente para lavado del prepucio, vulva y vagina, en bovinos, equinos, ovinos, porcinos, caprinos y caninos. En dosis de 1:5000 para pulverizaciones y concentraciones hasta el 1 %.

En humanos el clorhidrato de acriflavina se utiliza en forma tópica (0.02%) como colorante de contraste biológico junto con fluoresceína sódica para el diagnóstico de múltiples patologías como el cáncer de colon-rectal, cáncer gástrico y patología ya que colorea el núcleo y citoplasma de las células cancerígenas; ligadas a *Helicobacter pylori*. También se utiliza como agente antiviral, por ejemplo, en estudios recientes se le ha utilizado como tratamiento en pacientes con SIDA por

interactuar con el DNA de manera reversible (Mathe, 2001). Su uso es limitado porque presenta un potencial riesgo de mutagenicidad (Trovato & Crosta, 2011).

Mecanismo de acción

En 1954 Ruhland observó que este colorante es un tóxico que actúa a nivel nuclear y cromosómico e interrumpe la mitosis celular.

La actividad de la acriflavina en células procariotas (acción antibacteriana) como en eucariotas, está relacionada principalmente con su capacidad de unirse reversiblemente con el ADN, esto se debe a su estructura tricíclica plana, la cual se intercala o se inserta entre dos pares de bases cercanas de nucleótidos de la hélice del ADN. El espacio para la intercalación de un colorante en la hélice se cree que se produce por la extensión local y desenrollado de la cadena principal de desoxirribosa-fosfato sin perturbación significativa de puentes de hidrógeno entre pares de bases (Nasim & Brychcy, 1979), para interferir en las enzimas reguladoras de ADN: la topoisomerasa I y II, separando la doble hélice; y durante la replicación del ADN ocasiona mutaciones de corrimiento de lectura, es decir, cuando se añaden o se quitan pares de nucleótidos alterándose la longitud de la cadena, produciendo errores que originan la formación de proteínas anormales inhibiéndose procesos de reparación del ADN, además, al interactuar sobre las topoisomerasas, ocasiona la ruptura del DNA, induciendo a la célula a la apoptosis. La intercalación de las acridinas se produce en fragmentos del ADN con idénticas pares de bases en áreas con irregularidades en las cadenas, como el extremo de un cromosoma (eucariotas), cerca de la horquilla de replicación, o en un sitio en el que se produzca recombinación (Fig. no.3).

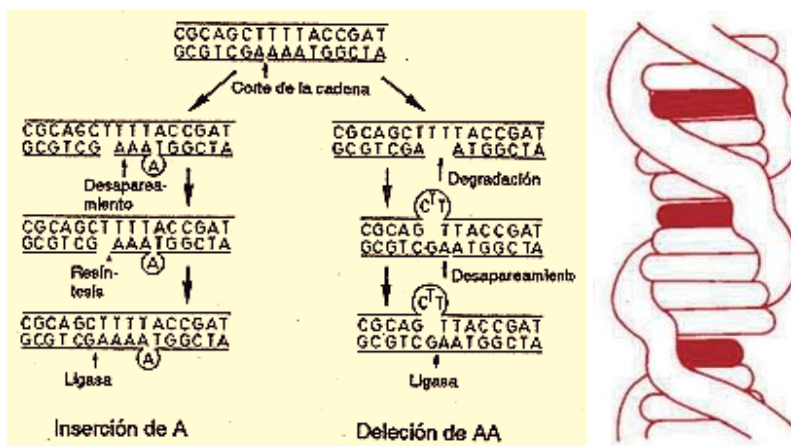


Figura 3. Mecanismo de mutación por inserción o delección de nucleótidos por acridinas (Nasim & Brychcy, 1979).

En actividad antifúngica, aumenta la permeabilidad mitocondrial y la posterior liberación del citocromo c, reprimiendo la activación del receptor de membrana plasmática, ocasionando el colapso del gradiente electroquímico de protones a través de las membranas mitocondriales. Como consecuencia, la síntesis de ATP disminuye conduciendo a la muerte celular (apoptosis). (Yang *et al.*, 2011).

Se han descubierto propiedades genotóxicas que conducen a la mutagenicidad, toxicidad reproductiva y carcinogenicidad, y se ha demostrado que resulta en un aumento del riesgo de tumores secundarios en pacientes con terapias basadas en acridinas (Nasim *et al.*, 1979; Ferguson *et al.*, 1991).

Otra importante propiedad fisicoquímica de acridinas (acriflavina), como en los colorantes derivados de tiazina (azul de metileno), es su capacidad para absorber energía lumínica. El colorante es excitado por la primera absorción de la luz a la longitud de onda apropiada, y en este estado excitado, es entonces capaz de ser reducido. Después de la reducción, el colorante reacciona con el oxígeno en estado triplete (estado fundamental del oxígeno), para formar el oxígeno singlete (estado excitado), el oxígeno excitado reduce el Fe^{+3} a Fe^{+2} . El peróxido de hidrógeno reacciona con el Fe^{+2} para formar el radical hidroxilo, este ataca a cualquiera de los componentes celulares, incluyendo, en particular, el ADN, formando un complejo intercalado con el colorante. Como consecuencia, varios derivados de la serie de acridina inducen foto propiedades farmacológicas, principalmente de foto toxicidad, actividad foto bactericida y de mutagenicidad. (Benchabane *et al.*, 2009).

1.3.6 Colorantes De Tiazina

Los colorantes básicos de **Tiazina** se derivan de las indaminas mediante la introducción de un puente de azufre entre los anillos hexagonales y se obtienen mediante sulfuración directa de las indaminas con ácido sulfhídrico en presencia de agentes oxidantes. (Rudolph, 1986). El cromóforo de este tipo de colorantes es catiónico. Entre ellos el más conocido es el **Azul de Metileno**.

- **Azul de Metileno**

Su nombre científico es 3,7-bis (dimetilamino)- Cloruro de fenazationio, o también llamado Cloruro de Metiltionina. Fue descubierto en 1876 por Caro y Lauth. En acuicultura, este colorante es eficaz contra infecciones fúngicas superficiales y protozoarias en el cultivo de peces y puede ser utilizado como una alternativa al verde de malaquita. También se utiliza en la prevención de proliferación bacteriana durante el transporte de organismos de cultivo (Fajardo, 2002).

Tabla 10. Propiedades Físico-Químicas del Azul de Metileno.

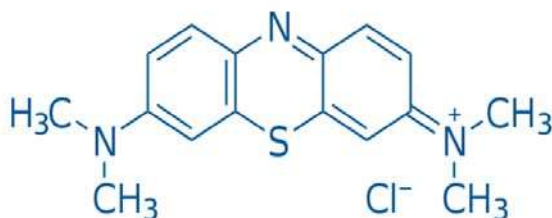


Figura 4. Estructura del Azul de Metileno

PROPIEDADES	
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S
Peso molecular	319,85 g/mol
Solubilidad	(20 °C) ~ 50 g/l
Apariencia física	Sólido azul oscuro
Punto de Fusión	100–110 °C
Densidad	1.757g/cm ³
Absorbancia (λ _{máx.})	661 nm
Rango de p H (a 10g/l en H ₂ O)	~3 a 20°C
Log Po/w	5.85

Se utiliza en una sola aplicación como un baño a 3 ppm. El azul de metileno puede ser manejado para el tratamiento de Ictioftiriasis (enfermedad del punto blanco), enfermedad de terciopelo, Costiasis, enfermedades de los peces de coral, Chilodonelliasis y como medicina paliativa en todos los casos de enfermedad de las

branquias, donde los peces sufren de dificultad en la respiración. Es particularmente eficaz contra *Saprolegnia*, *Costia*, *Trichodina* y especies de *Chilodonella* mediante la aplicación a un baño de larga duración de 3 mg/l o de 30 mg/l para el baño de corta duración. Se puede usar para el tratamiento de micosis tegumentaria en todas las edades de peces de agua dulce en estanques y canales en una tasa de aplicación de 2 a 2.5 mg/l en un baño permanente. Cuando se usa contra la infección bacteriana en branquias, se utiliza en un baño a concentraciones de 8-10 ppm. También se aplica en el tratamiento de cuarentena de los peces de acuario con baños de 1 ppm. A concentraciones de 1-2 ppm, para el tratamiento de *Ichthyophthirius multifiliis* (Tonguthai & Chanratchakool, 1992).

En otras actividades, se utiliza ampliamente como pigmento de fibras acrílicas, poliéster, papel y en la fabricación de tintas. Asimismo posee abundantes aplicaciones en el campo de la Química Analítica, siendo un reactivo de reconocida eficacia en la detección de ciertos cationes y aniones como Ta^{5+} , Sn^{2+} , S^{2-} y ClO_4^- . (Burriel *et al.*, 1999; Torres, 2010). En otros se ha mostrado utilidad en el campo biológico y el médico. Un ejemplo en este sentido es su utilización para distinguir entre ADN y ARNt (Barret *et al.*, 1997; Torres, 2010). Este colorante se maneja en los laboratorios de análisis ambiental para la determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM), como son los detergentes (Bautista, 2011).

A causa de la facilidad con que se reduce formando una leucocombinación (incolora), se puede utilizar como aceptor de hidrógeno que se reconoce por su fácil decoloración, en las reacciones bioquímicas de Óxido-Reducción. (Rudolph, 1986). Es usado como un fijador y colorante básico para el diagnóstico de protozoos parásitos, células sanguíneas y otras preparaciones microscópicas (Iannacone *et al.*, 1999; Costamagna *et al.*, 2004). En Salud Pública al azul de metileno se le usa para el tratamiento de la metahemoglobinemia, se reduce a azul de leucometileno como antídoto reduciendo Fe^{3+} a Fe^{2+} , convirtiendo la MHb a Hb aunque en dosis o concentraciones elevadas ocasiona Metahemoglobinemia (Clifton & Leikin, 2003; Stocche *et al.*, 2004) y para casos de intoxicación por herbicidas (Watt *et al.*, 2005). En 1881, Ehrlich reportó al azul de metileno como el primer antimalárico sintético, en la actualidad se sigue utilizando para el tratamiento de la malaria ya que inhibe el 50% del crecimiento eritrocítico parasitario de *Plasmodium berghei* y *P. yoelii nigeriensis* (Garavatio *et al.*, 2008).

Se utiliza en la desinfección de aguas, debido a que este colorante genera especies reactivas de Oxígeno los cuales son agentes oxidantes (oxígeno singlete) mediante su irradiación o su fotosensibilización con energía solar (García, 2002; Orellana *et al.*, 2006).

Mecanismo de acción

La toxicidad para la biota marina de ciertos compuestos antropogénicos aumenta si después de la absorción hay exposición al sol. Este efecto se conoce como fototoxicidad o toxicidad fotoinducida y se muestra por varios compuestos aromáticos policíclicos como los colorantes de acridina y el Azul de Metileno (Peachy & Crosby, 1996; Lee & Kim, 2002).

El Azul de Metileno al absorber energía en forma de luz UV visible genera Oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$) (Tuite & Kelly, 1993), por transferencia de energía desde el estado electrónico excitado del colorante al oxígeno presente en el medio. El oxígeno singlete se presenta como un agente fuertemente oxidante y frecuentemente es el responsable de los efectos tóxicos en los sistemas vivos producidos por fotosensibilización bajo condiciones aeróbicas. Prácticamente todos los tipos celulares, desde procariotas hasta eucariotas, sufren daños irreversibles por exposición al $^1\text{O}_2$ que conducen a la muerte celular. (Soncin *et al.*, 2002; Dahl, 1994; Nagano *et al.*, 1994; Ben-Hur *et al.*, 1995). Precisamente las reacciones del oxígeno singlete están involucradas en la fotomodificación de otras membranas como las de los glóbulos rojos, mitocondrias, microsomas y liposomas (Orellana *et al.*, 2006; Vargas & Rivas, 2004). Fácilmente puede atravesar la membrana celular y anclarse a la mitocondria, lisosomas y sobre la doble hélice del DNA. Este colorante es hidrofílico y esto determina su localización intracelular. Sufrir reducción formando Azul de Leucometileno después de la excitación electrónica, esta leucobase genera agentes oxidantes como el H_2O_2 y O_2^- los cuales pueden dañar los sustratos biológicos directamente, o en presencia de Fe^{+3} se genera OH^- causando la formación de residuos de guanina oxidados, en particular 8-hidroxiguanina en el DNA (Gabrielli, 2004; Yao & Zhang, 1996; Zhang & Tang, 2005; Oliveira, 2006; Wainwright *et al.*, 1997). El azul de metileno, además induce la apoptosis celular mediante la generación de especies reactivas del oxígeno en presencia de luz (ROS, como el $^1\text{O}_2$, OH^- , H_2O_2 , etc) el cual desencadena una cascada apoptótica

aumentando en la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bad, Bcl-xL), este tipo de proteínas producen una especie de poro en la membrana externa de la mitocondria y la pérdida de potencial de membrana que permite la posterior liberación del citocromo c en el citosol de la célula, y la activación de caspasas (caspasa-3), las cuales son mediadoras esenciales en el proceso de apoptosis celular (Yan Lu *et al.*, 2008), en la figura 5 se muestra el mecanismo de acción del colorante.

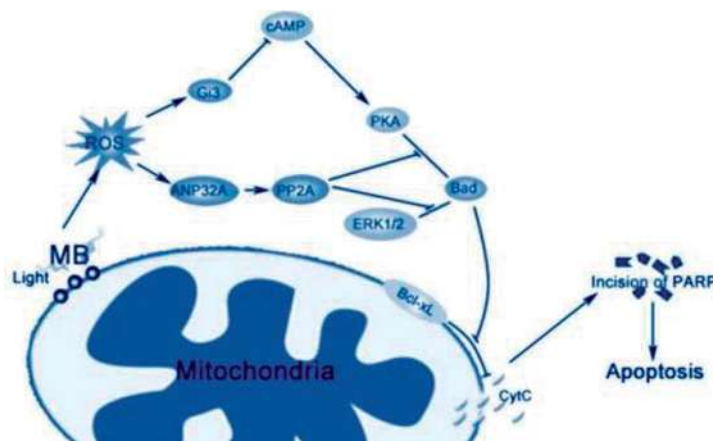


Figura 5. Mecanismo de inducción de apoptosis celular por Azul de Metileno (Yan Lu *et al.*, 2008).

Asimismo el azul de metileno cuando existe deficiencia de G6PD, oxida directamente por medio del $^1\text{O}_2$ al NADPH a NADP^+ , el cual es el donante de electrones para reacciones enzimáticas entre ellas la catalizada por la glutatión reductasa y ésta es esencial en la protección del eritrocito contra el estrés oxidativo; así generando anemia hemolítica (Acosta *et al.*, 2003).

El Azul de Metileno también inhibe la guanilil ciclase, inactivando la producción de GMPc y un aumento en el calcio citosólico, fosforilación de la cadena liviana de la miosina y por lo tanto contracción muscular, inhibiendo el efecto vasodilatador del óxido nítrico (Ignarro *et al.*, 1984), en la figura 6 se muestra el mecanismo sobre la guanilil ciclase.

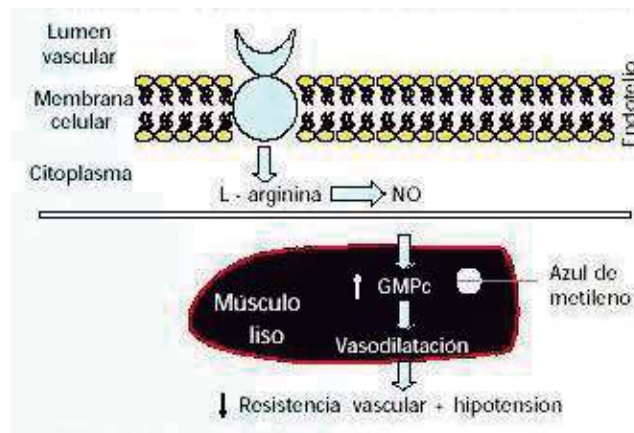


Figura 6. Mecanismo de acción del Azul de Metileno en la vía del Óxido Nítrico (Viaro *et al.*, 2002).

1.3.7 Colorantes derivados del Trifenilmetano

Entre los más representativos se encuentra el Cristal Violeta, Verde brillante, **Verde de Malaquita, etc.** Poseen colores fuertes y brillantes, son usados de manera extensiva en la industria textil, papelería, en la tinción del cuero, algunos de estos colorantes son utilizados en la industria cosmética, y en la industria alimentaria; en medicina veterinaria se utilizan en el tratamiento de infecciones externas ocasionadas por hongos, protozoarios y bacterias (Azmi, 1998).

El Verde Malaquita se forma mediante condensación de benzaldehído con 2 moléculas de dimetilanilina los cuáles le aportan los grupos amino al posterior colorante en una solución de ácido clorhídrico, obteniendo la base incolora o la leucobase del colorante, y por oxidación con dióxido de plomo se forma el cromóforo del verde de malaquita, el átomo de H del metano no sustituido y el ión hidrógeno del grupo amino se separan en forma de agua y así uno de los dos anillos bencénicos toma la forma quinoidea, con lo que se forma el colorante obteniéndose la sal coloreada (en forma de oxalatos o de sales dobles con el cloruro de zinc). (Hortal, 1987).

Debido a su baja biodegradabilidad, algunos de estos colorantes han sido reportados por acumularse en la superficie del agua y los sedimentos (Nelson & Hites, 1980). La toxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de algunos de estos colorantes los convierte en un problema ambiental significativo (Horsefield *et al.*, 1976; Black *et al.*, 1980).

- **Oxalato de Verde de Malaquita**

El **Oxalato de Verde de Malaquita** es un colorante N-metilado diaminotrifenilmetánico, su nombre de acuerdo a la CA Index es Methanaminium, N-[4-[[4-(dimethylamino) phenyl]phenylmethylene]-2,5-cyclohexadien-1-ylidene]-N-methyl-, ethanedioate, ethanedioate (2:2:1). En acuicultura es el colorante más utilizado como desinfectante, especialmente en granjas de salmónidos. Su actividad fungicida fue conocida en la década de los 30's. En 1950 se utilizó como un antiséptico y en el tratamiento contra parásitos tanto internos como externos. En 1960, se demostró que Verde de Malaquita proporcionaba una alta actividad antiprotozoaria particularmente contra *Ichthyophthirius multifiliis*, *Ichthyobodo necator*, *Trichodina sp.*, *Trichodinella sp.*, *Chilodonella sp.*

Es uno de los colorantes más importantes con actividad fungicida, se encontró que de 49 compuestos fungicidas tratados, es el más efectivo contra los hongos oomicetos (Campbell *et al.*, 2001) y para el hongo de agua *Saprolegnia sp.* en huevos de peces. Se le usa como monocomponente en varias concentraciones en baños o bien como multicomponente en combinación con formaldehído, verde brillante, cristal violeta, azul de metileno, etc.

En acuicultura ornamental (Sudova *et al.*, 2007), se utilizan inmersiones de 10 a 30 segundos en un rango de concentración de 66.7-100mg/l en el tratamiento de infecciones fúngicas externas. En baños de corta duración se utiliza de 1 a 1.5h de duración con una concentración de 6.7mg/l.

En baños de larga duración (6 días) se utilizan concentraciones de 0.5mg/l en carpas, y otras especies con importancia en fuente de alimentación humana (Svobodova *et al.*, 1997).

También se utilizan bajas concentraciones de 0.15 a 0.20mg/l en salmónidos. Una de las preparaciones más conocidas es la utilizada con 3.5g de Verde de Malaquita como multicomponente en combinación con 3.5g de Azul de metileno disueltos en 1000ml de Formaldehído, tomando de 1.5 a 3 ml de la solución para 100L de agua (Sudova *et al.*, 2007).

Tabla 11. Propiedades Físico-Químicas del Oxalato de Verde Malaquita.

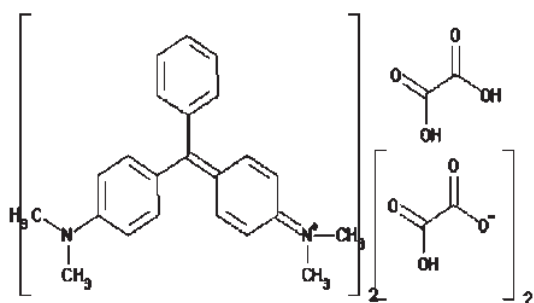


Figura 7. Estructura del Oxalato de Verde de Malaquita

PROPIEDADES	
Fórmula molecular	$C_{52}H_{54}N_4O_{12}$
Peso Molecular	927 g/mol
Estado físico	Cristales verdes
Solubilidad	110 g/l (24°C en H_2O)
Absorción ($\lambda_{m\acute{a}x.}$)	614nm
Punto de fusión	164°C
Rango de p H	0.0 amarillo a 2.0 verde, 11.6 verde, 14 incoloro
pK_a	6.90

Por otra parte, también se utiliza como un agente colorante alimentario, desinfectante médico y antihelmíntico, así como colorante en la tinción de la seda, en las industrias de la lana, yute, cuero, algodón, papel, acrílico, industria cosmética, farmacéutica, impresión, etc (Srivastava *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2009; Sharma, 2011). Sin embargo, este colorante se ha convertido en un compuesto altamente controversial debido a los riesgos que supone el consumir especies de la acuicultura tratados con Verde de Malaquita (Alderman & Clifton-Hadley, 1993).

Ha sido identificado como sustancia nociva por el comité de la OMS/FAO (OMS, 1965) y prohibido en algunos países debido a su citotoxicidad en varias células de mamíferos. También se ha reportado que causa carcinogénesis, mutagénesis, fracturas cromosómicas, teratogenicidad y toxicidad respiratoria en ratones. En salud pública causa efectos en el sistema inmunológico, sistema reproductivo y propiedades genotóxicas y carcinogénicas (Fernandes *et al.*, 1991; Rao, 1995; Gouranchat, 2000). A pesar de la gran cantidad de datos sobre sus efectos tóxicos, Verde de Malaquita se sigue utilizando como un parasitocida en la acuicultura y otras industrias (Youn-Jung *et al.*, 2008).

Mecanismo de acción

Tanto Verde de malaquita como su forma reducida, Verde de leucomalaquita son persistentes en el ambiente y se plantean como un problema potencial ambiental presentando toxicidad aguda para una amplia variedad de animales acuáticos y terrestres (Srivastava *et al.*, 2004). Además provocan graves riesgos para la salud pública. Desciens & Bablet (1994) reportaron que el verde malaquita es una toxina multiorgánica.

El principal objetivo celular del Verde de Malaquita es en las mitocondrias en peces y mamíferos (Zahn & Braunbeck, 1995). Después de la absorción, el verde malaquita se reduce a verde de leucomalaquita, que es la forma persistente el colorante (Culp *et al.*, 2006).

Verde de Leucomalaquita actúa como un tóxico respiratorio enzimático (Alderman, 1985; Srivastava *et al.*, 2004). La subunidad beta de la ATP sintasa es significativamente bajo después de la exposición al colorante en consecuencia la posterior disminución de la síntesis de ATP a partir de la última etapa de la cadena transportadora de electrones. Más específicamente, Verde de Malaquita promueve una pérdida del potencial de membrana mitocondrial acompañada de un edema mitocondrial. El colorante es lipófilo y directamente puede alterar la bicapa lipídica de las membranas celulares provocando un aumento de la permeabilidad de la membrana (Srivastava *et al.*, 2004). Esta transformación en la permeabilización mitocondrial es ocasionada por la inhibición respiratoria atribuible a la liberación de citocromo c el cual es producido por la oxidación de NAD(P)H a NAD(P)⁺ (Kowaltowski *et al.*, 1999).

Cuando el potencial de la membrana mitocondrial se pierde, el Verde de Malaquita estimula la expresión del factor inductor de apoptosis programada (PDCD8) y es liberado de las mitocondrias hacia el citosol y termina finalmente en el núcleo de la célula donde se une al ADN. Esto normalmente se inicia en una transducción de señales resultante de la inducción de una vía independiente de caspasas de la apoptosis, provocando la fragmentación del ADN y la condensación de cromosomas induciendo la apoptosis celular. (Kowaltowski *et al.*, 1999; Candé *et al.*, 2002; Bras *et al.*, 2005; Pierrard *et al.*, 2012).

En otro contexto, Verde de Malaquita induce la sobre expresión de proteínas encargadas en la transducción de señales y en procesos de migración, adhesión

diferenciación y división celular, como la integrina $\beta 3b$; y la proteína sept 2 la cual tiene funciones de organización del citoesqueleto durante la fase final de la mitosis, formando un anillo entre las 2 células separando a la célula madre de la célula hija. (Gupta *et al.*, 2003; Pierrard *et al.*, 2012). Rao (1995), demostró que este colorante inhibe la síntesis del DNA, por actuar sobre el receptor EGF y en los eventos de la transducción de señales mediada por el receptor activado en el ciclo celular, así presentándose como un promotor tumoral en hígado de ratas.

Doergehan *et al.*, (1998), demostraron que verde de leucomalaquita inhibe la peroxidasa tiroidea, la enzima que cataliza la yodación y reacciones de acoplamiento necesarios para la síntesis de la hormona tiroidea (TSH). Por ende, la exposición crónica a verde de leucomalaquita podría causar tumores de células foliculares de la tiroides a través de la estimulación hormonal de TSH. Verde de Malaquita sufre una reducción a Verde de Leucomalaquita, catalizada por citocromo P-450 por medio de una N-desmetilación produciendo metabolitos de amina primaria y secundaria los cuales son similares a arilaminas cancerígenas y son oxidados a metabolitos por la tiroperoxidasa (TPO) que reaccionan con el ADN, ya sea directamente o después de la esterificación dando lugar a tumores en tiroides y en hígado de ratones (Figura 8) (Culp *et al.*, 1999).

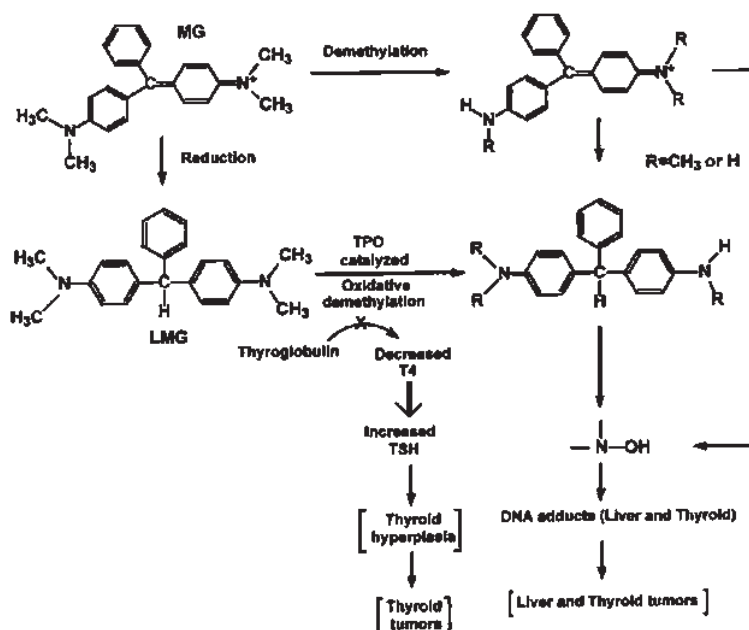


Figura 8. Mecanismo del metabolismo de Verde de Malaquita en ratones y sus efectos (Culp *et al.*, 1999).

Además, este colorante forma aductos en el DNA *in vivo* estimulando la reparación del DNA produciendo mutaciones (Renwick *et al.*, 2010).

1.4 BIOINDICADORES Y ***Artemia franciscana***

1.4.1 Bioensayos

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 agua, aire, suelo y sedimento, así como de la biota asociada y por ende de los ecosistemas. Estos efectos dependen de la concentración en la que se encuentren dichas sustancias, de su persistencia y biodisponibilidad, pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras. Los tóxicos que entran a las aguas marinas de fuentes urbanas, agrícolas e industriales pueden permanecer suspendidos en la columna de agua, ser incorporados a la biota acuática o depositarse sobre el fondo e incorporarse en los sedimentos marinos. Algunos de estos contaminantes químicos son persistentes, mientras que otros son más susceptibles a transformaciones físicas, químicas o biológicas (Beg *et al.*, 2001). La investigación formal de los efectos adversos de los contaminantes sobre los organismos se inicia en la década de los 30's, 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) (Ramírez & Mendoza, 2008).

Actualmente, para valorar tales efectos adversos se necesitan *de bioensayos ecotoxicológicos* que sean simples y confiables, y permitan además identificar y evaluar los efectos potenciales de los contaminantes generados por actividades agrícolas, acuícolas, industriales y urbanas, sobre componentes biológicos en el ecosistema marino (Törökné *et al.*, 2007).

Estos ensayos consisten en la exposición de grupos de organismos a determinadas concentraciones del tóxico por un tiempo determinado. Los organismos deben estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y se mantienen en condiciones ambientales constantes. Además se dispone de grupos control (que no se exponen al tóxico).

Después se mide y se registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados con los distintos contaminantes en estudio y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos. Los efectos tóxicos a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento de la población, alteración del comportamiento, etc., determinándose distintas variables como, por ejemplo, la concentración letal 50 (CL₅₀), que es la concentración letal para el 50 % de los individuos expuestos. Cuanto menor sea el valor de CL₅₀ para un determinado producto, más elevada será su toxicidad. Las condiciones de los cultivos y los ensayos deben estar altamente estandarizadas para permitir la comparación de los resultados. Los resultados obtenidos de la aplicación de los bioensayos de toxicidad han demostrado que pueden ser usados para identificar áreas de mayor o menor contaminación, también pueden ayudar a la selección de sitios para los cultivos de especies acuáticas, son utilizados en programas de monitoreo ambiental evaluando la calidad del agua, así como los efluentes residuales que vierten en ríos y zonas costeras; también se han utilizado para determinar la relación entre efectos tóxicos y biodisponibilidad (Ingersoll, 1995; Chapman, 2007).

Los ensayos pueden ser de laboratorio con un número reducido de especies, y en condiciones estandarizadas que se reproducen sólo en forma parcial a las condiciones naturales en el ambiente, o de campo con “encierros” sometidos a las condiciones del medio. Los organismos empleados para los ensayos deben tener alta sensibilidad a los tóxicos, ya que al establecer las concentraciones seguras para ellos se espera proteger a todo el ecosistema, pero hay que tener en cuenta que distintas especies tienen diferente sensibilidad a distintas sustancias químicas. Las características que debe de tener un bioensayo de toxicidad de acuerdo a Ramírez y Mendoza (2008) se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 12. Criterios para la selección de bioensayos en laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas (Rámirez & Mendoza, 2008)

Facilidad	• Bajo costo • Materiales y reactivos disponibles • 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, taxonómico, de una ruta de exposición • Con información sobre su sensibilidad a compuestos tóxicos (base de datos) • Estadio más sensible • Respuesta relevante a compuestos más tóxicos • Sensibilidad a bajas concentraciones • Sensibilidad a una amplia variedad de compuestos tóxicos • Sensibilidad no redundante con otras especies • Información sobre su biología
De la prueba	• Condiciones presentes en los ecosistemas (temperatura, salinidad, etc. Por ej. En México) • Concentraciones químicas reales que se presenten en el ecosistema • Técnicamente seguros y no contaminantes • Posibilidad de ser estandarizada • Exactitud y precisión analíticas • Significado ecológico de los resultados • Requerimientos mínimos de supervivencia y reproducción en pruebas y testigos • Comprobación de concentraciones nominales

En países desarrollados, esta problemática se ha canalizado efectivamente a través de esquemas normativos que incluyen de manera importante la determinación de los efectos sobre los sistemas biológicos, tanto en exposiciones de corto como de largo plazo (Hobbs *et al.*, 2005), y se ha llegado incluso hasta el nivel de no sólo determinar lo que ocurre con las especies aisladas, representativas de estos ambientes, sino que se han impulsado de manera importante los estudios sobre las rutas y mecanismos de transporte de los contaminantes en los ecosistemas y la determinación de la acumulación, transformación y efectos diferenciales que ocurren en las comunidades que habitan ahí. En México todavía es primitiva la introducción de criterios biológicos en la normatividad ambiental, pues se sustenta en estándares de calidad ambiental que se basan en niveles máximos permisibles para algunos contaminantes considerados como importantes por sus efectos biológicos, pero sin que exista una evaluación biológica que permita determinar si tales estándares son en realidad efectivos para lograr la protección de la vida acuática (Martínez *et al.*, 2008). Esto exige el desarrollo o adaptación de una serie de pruebas biológicas para medir directamente los efectos tóxicos en los organismos y en los ecosistemas. Este requerimiento surge debido a la necesidad de adaptar los bioensayos a las condiciones particulares de México, ya que la gran mayoría de las pruebas estandarizadas hoy en día han sido desarrolladas utilizando organismos y condiciones presentes en las áreas templadas del mundo. México, por el contrario, presenta vastas regiones subtropicales y tropicales que difieren en temperatura, iluminación, entre otras condiciones ambientales, lo cual puede cambiar no solamente el comportamiento fisicoquímico de los contaminantes, si no también el metabolismo de los organismos (Johannes y Betzer, 1975). Contar con estos procedimientos le permitirá al país tener avances importantes en la protección del ambiente acuático.

1.4.2 Bioindicadores

La evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes, se realiza a través de una exposición controlada de organismos de prueba seleccionados que deseablemente son representativos de las comunidades en los ambientes acuáticos, a concentraciones establecidas de compuestos químicos (puros o en mezclas), o bien directamente a diluciones de muestras de efluentes contaminantes, muestras de agua de sistemas receptores de descargas, o muestras de formulaciones químicas comerciales, de composición conocida o desconocida, cuya toxicidad desea determinarse, normalmente en exposiciones cortas, lo que permite expresar el resultado como una concentración letal media (CL_{50}), para un tiempo de exposición determinado. También es necesario el poder inferir posibles daños sobre las comunidades acuáticas en los sistemas receptores, a partir de esta variable (Dorn *et al.*, 1987, Chapman, 2000).

A estos organismos se les denomina **bioindicadores** o **indicadores ecológicos** ya que tienen la propiedad de responder a la variación de un determinado factor biótico o abiótico del ecosistema, de tal manera que esta respuesta quede reflejada en el cambio de un valor o más variables de cualquier nivel de dicho organismo; a estas variables, cambios o características se les denomina *variables bioindicadoras*, ya que presentan efectos visibles tras ser expuestos a dichos contaminantes. Estos organismos tienen requerimientos físicos, químicos, de estructura del hábitat y de relaciones con otras especies. A cada especie o población le corresponden determinados límites de estas condiciones ambientales entre las cuales los organismos pueden sobrevivir (límites máximos), crecer (intermedios) y reproducirse (límites más estrechos). En general, cuando más estenoica sea la especie en estudio, es decir, cuando más estrechos sean sus límites de tolerancia, mayor será su utilidad como indicador ecológico. Las especies bioindicadoras deben ser, en general, abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, bien estudiadas en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una perturbación ambiental (Raz-Guzmán, 2000). El empleo de bioindicadores está enfocado no sólo para medir el riesgo de los contaminantes químicos en el ecosistema acuático, sino también para determinar el impacto potencial al ámbito humano. Así que no todos los organismos acuáticos podrán ser tomados como

bioindicadores, las adaptaciones evolutivas a diferentes condiciones ambientales y límites de tolerancia a una determinada alteración dan las características a ciertos grupos que podrán ser considerados como organismos sensibles por no soportar variaciones en la calidad del agua, mientras que otros organismos son característicos de agua contaminada por materia orgánica (Roldán, 1999). Cuando los parámetros son críticos, los organismos sensibles mueren y su lugar es ocupado por organismos tolerantes (Alba-Tercedor, 1996). De tal forma que los cambios de la estructura y composición de las comunidades bióticas puede ser utilizada para identificar y evaluar el grado de contaminación de un ecosistema acuático. La evaluación de efectos tóxicos en el agua es limitado, si se considera la riqueza específica que es común encontrar en muchos de los ecosistemas naturales, y principalmente en los tropicales, que en su conjunto representan alrededor del 75% de la biodiversidad mundial (Lacher y Goldstein, 1997). La propuesta de otras opciones como organismos de prueba, generalmente se enfrenta a dificultades como la falta de información biológica para entender los mecanismos de reacción e interpretar adecuadamente las respuestas de intoxicación observadas, dificultades para obtener lotes confiables de organismos de ensayo (Arenzon *et al.*, 2003), falta de consistencia en los resultados, y falta de conocimiento de los intervalos normales de respuesta a fin de determinar cuando un resultado expresa realmente un efecto significativo. No obstante, es necesario buscar y proponer especies alternativas debidamente sustentadas, que proporcionen información más adecuada y fácil de entender y extrapolar, de acuerdo a las condiciones ambientales de la biota acuática que prevalece en áreas geográficas que no están incluidas en las zonas templadas del mundo (Kwok *et al.*, 2007).

Cairns & Dickson (1971), y De Zwart (1995); señalaron los siguientes beneficios al utilizar bioindicadores para evaluar los riesgos de los distintos xenobióticos en el ambiente acuático:

- Los datos biológicos son fácilmente accesibles como los físico-químicos
- Integran los efectos en un gran número de individuos. La respuesta biológica es integrativa y acumulativa en la naturaleza, especialmente en los niveles altos de la cadena trófica, reduciendo el número de medidas en espacio y tiempo.

- La existencia de conceptos biológicos, proveen una mejor información que otros descriptores para un cierto tipo de contaminación.
- Miden la bio-habilidad de los compuestos, integrando concentración y su toxicidad intrínseca.

La facilidad de cultivo, manejo y sobre todo por su importancia ecológica, con frecuencia se recurre a especies planctónicas como organismos de prueba, pues son un componente fundamental en la comunidad zooplanctónica, siendo un grupo dominante que funciona como el enlace principal entre los productores primarios y los consumidores de niveles tróficos superiores (Mount & Norberg 1984).

En este trabajo de investigación se presenta como modelo bioindicador al micro crustáceo *Artemia franciscana*, ya que constituye al primer nivel de la cadena trófica (zooplancton) de ecosistemas acuáticos salinos. *Artemia* presenta una alta adaptabilidad a rangos grandes de salinidad (5-250g/L) y de temperatura (6-35°C), tiene un ciclo de vida corto, una alta fecundidad presentando una estrategia de reproducción (reproducción bisexual/partenogénica), es decir, la formación de quistes, los cuales resisten condiciones extremas de salinidad, temperatura, concentraciones de oxígeno, radiación solar, etc. Obteniendo así su posterior activación de metabolismo y ulterior eclosión de los nauplios. Además *Artemia* se exhibe como un organismo filtrador no selectivo, es decir, presenta una adaptabilidad a varios nutrientes y es resistente a la manipulación. Pérez *et al.*, (2010) determinaron que la repetitividad y reproducibilidad de los bioensayos a corto plazo con *Artemia* son al menos iguales, que los ensayos utilizando *Daphnia spp.* Y en algunos casos a los valores obtenidos utilizando *Brachydanio spp.* Con las características intrínsecas anteriormente mencionadas, *Artemia* es un organismo adecuado para ser utilizado como bioindicador en bioensayos de ecotoxicidad acuática, garantizando la fiabilidad, viabilidad y la relación de coste-eficacia en la investigación ecotoxicológica de xenobióticos. (Nunes *et. al.*, 2006), además la norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI establece a la *Artemia franciscana* como bioindicador 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.

1.4.3 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ARTEMIA

Clasificación Taxonómica

Phylum	Artrópoda
Clase	Crustacea
Subclase	Branquiópoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	Artemia, Leach 1819

Artemia es un crustáceo perteneciente a la Subclase Branquiopoda, de mayor distribución mundial, por ser cosmopolita (Sorgeloos, 1987). Se caracterizan por estar dotados de apéndices torácicos en forma de hoja, y al orden Anostraca, por la ausencia de un caparazón rígido (Bartolomé, 2005). El género *Artemia* es un grupo de poblaciones de especies hermanas las cuales se clasifican de acuerdo a su sistema de reproducción. Entre las cepas bisexuales de *Artemia* se han descrito 6 especies hermanas: *Artemia salina* (procedente de Lymington, Inglaterra), *Artemia tusiniana* (procedente de Europa), *Artemia franciscana* (América Norte, Centro y Sur), *Artemia persimilis* (procedente de Argentina), *Artemia urmiana* (Irán) y *Artemia monica* (procedente de Mono-Lake, CA-USA). Algunas cepas partenogenéticas han sido encontradas en Europa y Asia, entre ella está la *Artemia partenogénica* (Abreu-Grobois y Beardmore, 1980).

Artemia habita en lagos salados y estanques hipersalinos distribuidos por todo el planeta. Al mismo tiempo, podemos encontrar a este organismo bajo condiciones climáticas extremas que pueden ir desde el trópico húmedo y subhúmedo hasta el clima árido (Vanhaecke *et al.*, 1987). Se adaptan a condiciones que oscilan dentro de un amplio margen de temperatura (6–35°C), con una salinidad de 5-250g/L y aguas ricas en cloruros, sulfatos y carbonatos. (Bowen *et al.*, 1978 Sorgeloos, 1979). Tienen una adaptabilidad a varias fuentes de nutrientes actuando como un filtro

alimentador no selectivo, debido a esta capacidad que tiene la *Artemia* de incorporar y almacenar minerales como Fe, Cu, Zn y Mn, los cuales se ven reflejados en las células embrionarias y quistes. Estos minerales actúan como componentes esenciales de enzimas (arginasa y pepetidasa) por lo que intervienen en el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos y en la síntesis de ácidos nucleicos (Nunes *et. al.*, 2004, Akiyama *et. al.*, 1993). Son fuente de alimento para peces, aves, y varios invertebrados. Son capaces de sintetizar eficazmente hemoglobina y poder hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disuelto que existen en los ambientes hipersalinos (Gilchrist, 1954, & Liu, 1987; Civera, 1993). Además la hemoglobina de los crustáceos que forman quistes, se transforma en hematina y se deposita en el corión incrementando su grosor y de esta manera el corión se vuelve protector del embrión a las altas salinidades y de la intensa radiación solar. Presenta tolerancia a concentraciones variables de oxígeno, de acuerdo a Amat (1985), lo que le permite adaptarse frente a condiciones extremas.

1.4.4 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE LA ARTEMIA

Crustáceo primitivo, caracterizado por un gran número de segmentos en el cuerpo, dividido en cabeza, tórax y abdomen, posee una serie de apéndices no especializados llamados *toracópodos*, en la parte anterior-lateral del cuerpo, los dos segmentos posteriores del tórax corresponden a la zona genital, el abdomen corresponden a seis segmentos posteriores y concluye con el telson y el cual termina en una corta cola caudal. Posee una serie de anténulas filiformes. En la cabeza de los adultos pueden observarse un par de ojos compuestos y uno simple, los nauplios por su parte, constan de un ojo medial hacia el final anterior denominado ojo naupliar. El apéndice del primer segmento de la cabeza es el primer par de antenas, las cuales no son articuladas y presentan quimio-sensores (Fig. 9) (Pacheco, 2011).

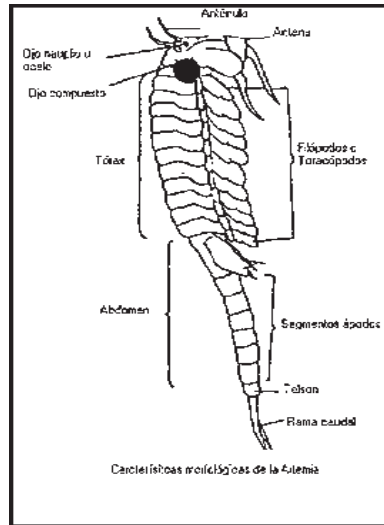


Figura 9. Características morfológicas de *Artemia*

Los quistes de *Artemia* tienen forma bicóncava antes de hidratarse, después toman forma esférica al hidratarse, el embrión recobra su metabolismo reversible interrumpido. Después de 24 horas la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión. Durante las horas siguientes, el embrión abandona la cáscara del quiste colgando del “cascarón” vacío a la cual permanece aún unido. Dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, sus apéndices comienzan a moverse y en un breve periodo de tiempo la membrana de eclosión se rasga emergiendo el nauplio.

El primer estado larvario (Estado I) mide entre 400 y 500 micras de longitud, tiene un color pardo anaranjado debido a la acumulación de reservas vitelinas y posee tres pares de apéndices; el primer par de antenas que tienen la función sensorial, el segundo par de antenas con función locomotora y filtradora y las mandíbulas con una función de toma de alimento. Un único ocelo de color rojo también llamado ojo naupliar se encuentra situado en la cabeza entre el primer par de antenas. La cara ventral del nauplio se encuentra cubierta por un amplio surco que interviene en la toma de alimento. Su aparato digestivo no es todavía funcional permaneciendo aún cerrados la boca y el ano (Fig. 10).

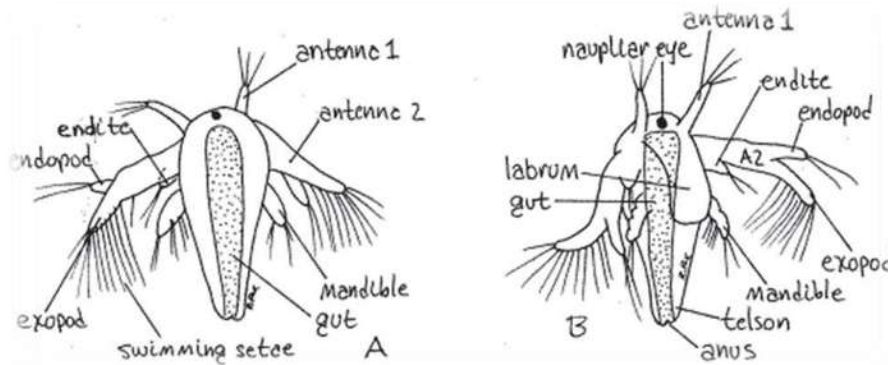


Figura 10. Nauplios de *Artemia*; (A) cara dorsal y (B) cara ventral.

Tras 24 horas después de la eclosión, la artemia evoluciona al segundo estado larvario (Estado II) o también llamado metanauplio de 24h. Mide aproximadamente 0.6mm. Pequeñas partículas alimenticias; tales como células de microalgas y bacterias con un tamaño que varía entre 1 y 40 micras son filtradas por el segundo par de antenas, siendo entonces ingeridas por un aparato digestivo ya funcional. Estas partículas son arrastradas al atrio bucal e ingresan al esófago, en seguida, a los ventrículos globulares los cuales tienen acción digestiva. A continuación, el alimento pasa al tubo intestinal que tiene forma de J, finalmente los restos del alimento filtrado son eliminados por el ano. El nauplio continúa su crecimiento apareciendo diferenciaciones a lo largo de las 15 mudas.

Las siguientes tres etapas (cada uno terminado por una muda) se clasifican como etapas de metanauplius. Algunas de las tendencias en el desarrollo durante estas últimas etapas incluyen apéndices más desarrollados en el aparato (maxilares y el maxilar superior) y un tórax más largo, con una definición de los segmentos torácicos. Así van apareciendo unos apéndices lobulares en la región torácica que se diferenciarán posteriormente en toracópodos los cuales tienen funciones natatoria, respiratoria y filtradora de partículas alimenticias. Se desarrollan ojos complejos laterales a ambos lados del ojo naupliar. Se producen importantes cambios tanto morfológicos como funcionales por ejemplo, las antenas pierden su función locomotriz y se transforman en elementos de diferenciación sexual. Los futuros machos desarrollan unos apéndices curvados y prensiles que servirán para el acto copulativo, mientras que las antenas de las hembras degeneran en apéndices sensoriales.

Los adultos de *Artemia* miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones partenogenéticas. Los adultos se caracterizan por un cuerpo alargado con dos ojos complejos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. Viven un tiempo aproximado de 4 meses. El aparato circulatorio está formado por un largo corazón tubular con un ostiolo en su extremo posterior y por varios senos en diversas zonas del cuerpo. A través del sistema circula hemolinfa y hemoglobina. El sistema respiratorio se encuentra directamente relacionado con la actividad locomotriz, ya que se localiza en los exopodocitos de los toracópodos actuando como branquias (Fig. 11).

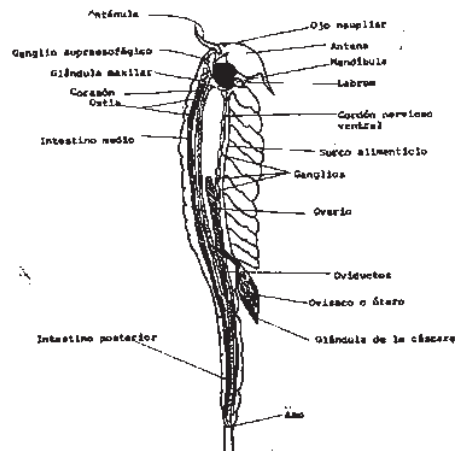


Figura 11. Sistema circulatorio y digestivo de *Artemia*.

El macho posee un par de piezas prensiles musculadas muy características en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se puede observar un par de penes. La hembra de *Artemia* no tiene apéndices distintivos en la región cefálica, pero puede ser fácilmente reconocida por el saco de puesta o útero que está situado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos (Fig. 12).

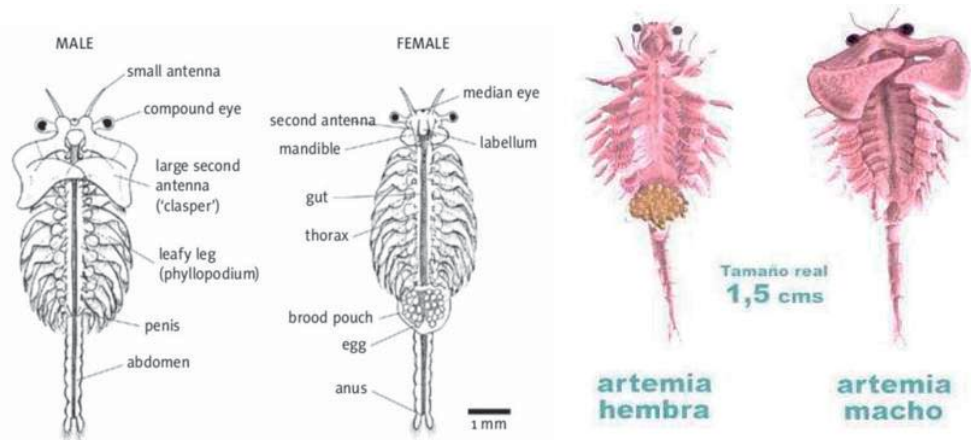


Figura 12. Diferencias morfológicas entre macho y hembra de *Artemia*.

Los huevos se desarrollan en dos ovarios tubulares situados en el abdomen. Una vez maduros, tienen forma esférica y se desplazan hasta el útero a través de dos oviductos. 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 curvadas. Las parejas pueden nadar de esta forma durante largo tiempo en lo que se conoce como posición de monta, para lo cual mueven sus toracópodos de forma sincrónica. La cópula es un rápido acto reflejo; la parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes es introducido en la abertura del útero fertilizando los huevos. En el caso de las hembras partenogenéticas la fertilización no tiene lugar y el desarrollo embrionario comienza tan pronto como los huevos han llegado al útero. A continuación, la hembra libera el contenido del útero al exterior (Reproducción ovípara). Los quistes generalmente flotan en las aguas hipersalinas y son llevados hasta las orillas donde se acumulan y se secan. Estos quistes se forman a partir de una secreción de hematina de las glándulas de la cáscara, formando una corteza de protección para mantener al embrión durante tiempo prolongado en estado de criptobiosis (anabiosis). Tiene ventajas en cuanto a la adaptación a condiciones extremas, por ejemplo de temperatura ya que resisten temperaturas de hasta -271°C o altas de entre $60-70^{\circ}\text{C}$ reduciendo su viabilidad en tan solo un 15% aprox. También resisten bajas presiones, acción de diversos disolventes y radiaciones (Bartolomé, 2005). El corión de los quistes desecados tiene la capacidad de captar agua hasta el 200% de su peso, ya que el metabolismo aeróbico en el embrión enquistado asegura la conversión de la trealosa, como carbohidrato de reserva, en glicógeno (como fuente de energía) y glicerol que son acumulados por el embrión en

la membrana cuticular externa. El incremento en la concentración de un producto altamente higroscópico como es el glicerol, ocasiona un mayor aumento en la asimilación de agua por el embrión a través de la membrana cuticular externa. Como consecuencia de este fenómeno se produce un aumento de la presión osmótica en el interior de la membrana cuticular externa hasta que se alcanza un punto crítico, momento en el cual se produce la ruptura de esta membrana y de la cáscara del quiste. La ruptura de la cáscara va acompañada de la liberación de todo el glicerol al medio de cultivo. El desarrollo del embrión hasta la eclosión dura aproximadamente 24 horas en condiciones adecuadas, llegando a su fase adulta en 20-30 días de vida libre alcanzando un tamaño medio de 7mm. (Fig.13).

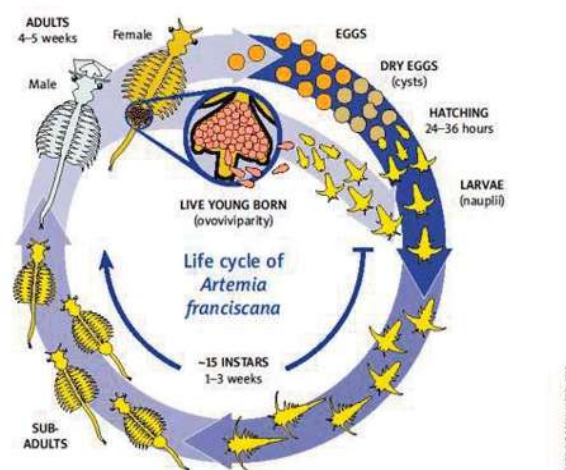


Figura 13. Ciclo de vida de *Artemia franciscana* (Tompkins & Dann, 2009).

1.4.5 *Artemia franciscana*

Es el anostraco más utilizado como alimento vivo para larvas de peces dulceacuícolas y marinos (García-Ortega, 2000; García-Ortega *et al.*, 2000; Lavens & Sorgeloos, 2000; Sato *et al.*, 2004; Moraiti-Loannidou *et al.*, 2007).

Es dominante en el continente americano, se encuentra distribuida desde Canadá hasta la zona central de Chile. Se distingue de otras especies ya que habita aguas con una mayor diversidad en composición química y con un mayor rango de salinidades que van desde 30 hasta 330g/l. Aunque de acuerdo a Triantaphyllidis *et al.*, (1995) y Agh *et al.*, (2008), reportaron que el máximo crecimiento de *A.*

franciscana en la forma juvenil fue observada a 35g/l de salinidad (10.16 ± 0.85 mm); mientras que a 40g/l de salinidad experimentan 100% de mortalidad. De acuerdo a Bowen *et al.* (1985), *A. franciscana* está considerada como un conjunto de subespecies aisladas tanto ecológica como fisiológicamente; estos grupos poblacionales pueden estar aislados reproductivamente en la naturaleza por ejemplo; *Artemia franciscana franciscana* (Kellog, 1906) del Gran Lago Salado, UTAH, EUA; y salinas costeras del Norte, Centro y Suramérica, aisladas con la población *Artemia franciscana monica* (Verril, 1869) del lago Mono en California, EUA o de *Artemia franciscana sp.*, que incluye a poblaciones de aguas carbonatadas como la que se encuentra en Nebraska, EUA (Browne & Bowen, 1991). En México, *Artemia franciscana* se encuentra distribuida en 17 sitios, 14 en cuerpos de agua salados costeros (4 en el golfo de México, 10 en costa del pacífico) y el resto de aguas interiores en condiciones de salinidad y de temperatura específicas, (Castro *et al.*, 2000). La diversificación entre poblaciones se debe a las diferencias que se encuentran en la composición química de los hábitats y por consiguiente en la intolerancia de cada población a habitar otro lugar diferente, al cual se encuentra aclimatada.

Resiste mejor a los factores abióticos, en comparación a las especies partenogenéticas, al observarse sobrevivencia y fecundidad significativamente mayores de *A. franciscana* (Triantaphyllidis *et al.*, 1995, Barata *et al.*, 1996), *Artemia franciscana* tiende además a presentar mejor éxito colonizador si se introduce en nuevos hábitats, desplazando a la fauna nativa (Williams & Geddes 1991). Presenta un comportamiento variable frente a la luz a lo largo de su desarrollo, mostrando inicialmente un fototropismo positivo, seguido de una corta fase de fototropismo negativo, y finalmente fototropismo positivo, esta variabilidad del comportamiento está vinculada a las necesidades de las primeras fases larvares de alcanzar niveles más someros de la masa de agua, posiblemente en busca de temperaturas más favorables que faciliten su desarrollo, así como alimentarse de la producción primaria en aguas superficiales (Valiela, 1995; Cebrián & Valiela, 1999). Durante las mudas son particularmente vulnerables, por lo que es posible que las larvas muestren un fototropismo negativo como respuesta a la búsqueda de aguas más profundas, o refugio, que reduzca tal vulnerabilidad frente a posibles depredadores (Rooth, 1965; Isenmann, 1975). Una vez que la *Artemia* ha alcanzado el estadio de

adulto, con toda la capacidad de movimiento que esto le permite, mostraría un comportamiento de fototropismo positivo en busca de la capa más iluminada donde se concentra el fitoplancton que le sirve de alimento.

El género *Artemia* es el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimento para los peces y crustáceos en acuicultura. Favoreciendo su uso en estudios de toxicidad aguda (Gómez, 2011).

2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

La presencia de productos terapéuticos antibacterianos utilizados en el sector acuicultura como son los colorantes Azul de Metileno, Clorhidrato de Acriflavina y Oxalato de Verde de Malaquita, son capaces de mostrar efectos toxicológicos (toxicidad aguda) en organismos no objetivo entre ellos a los planctónicos al cual pertenece el microcrustáceo de aguas salinas *Artemia franciscana*.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el manejo en altas concentraciones de una gran variedad de sustancias químicas en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades ocasionadas por ectoparásitos en el sector de acuicultura, cuando éstas son vertidas a los medios acuáticos en altas concentraciones generan residuos químicos los cuales presentan efectos tóxicos en organismos no objetivo.

Algunas sustancias de esta índole, por ejemplo productos químicos orgánicos ionizables o sustancias organometálicas pueden manifestar toxicidad diferente en agua dulce y en agua de mar. En consecuencia numerosas sustancias químicas no han sido específicamente evaluadas desde el punto de vista de sus efectos sobre el medio ambiente acuático, en particular en aguas costeras.

El uso de colorantes sintéticos como antiparasitarios en la acuicultura generan un riesgo no solo por sus propiedades tóxicas y cancerígenas, sino también porque inhiben la entrada de los rayos solares y ocasionen una disminución en la fotosíntesis, así mismo una reducción crítica en los niveles de oxígeno disuelto y otros son persistentes tanto en el ambiente acuático como en los organismos.

La importancia en la utilización de especies planctónicas como bioindicadores para evaluar efectos toxicológicos de numerosas sustancias químicas, por ejemplo la toxicidad aguda, permite desarrollar bioensayos toxicológicos que sean sencillos pero con una alta confiabilidad en sus resultados para predecir el impacto ecológico que conlleva el utilizar este tipo de productos de manera deliberada (intensiva) en la actividad acuícola.

Entre los organismos planctónicos, se presenta a *Artemia franciscana* como un excelente bioindicador para aguas salobres o salinas por su fácil manejo y cultivo pero sobre todo por su importancia ecológica ya que funciona como un enlace principal entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores. *Artemia* es un organismo adecuado para ser utilizado como bioindicador en bioensayos de ecotoxicidad acuática, garantizando la fiabilidad, viabilidad y la relación de coste-eficacia en la investigación ecotoxicológica de xenobióticos.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la toxicidad aguda de los colorantes tricíclicos orgánicos sintéticos: **Azul de metileno**, **Clorhidrato de Acriflavina** y **Oxalato de Verde de Malaquita**, a través de un bioensayo de procedimiento sencillo, con alta confiabilidad en los resultados y de bajo coste, utilizando como bioindicador *Artemia franciscana*.

3.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto tóxico agudo que se puede derivar de la presencia del colorante **Azul de Metileno**
- Determinar el efecto tóxico agudo del colorante **Clorhidrato de Acriflavina**
- Determinar el efecto tóxico agudo del colorante **Oxalato de Verde de Malaquita**
- Comparar la sensibilidad de los nauplios de *Artemia franciscana* a estos colorantes de acuerdo a las LC_{50} de 24, 48 y 72 horas de exposición de cada uno de los xenobióticos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Agua marina sintética

Para la preparación de agua de mar sintética se utilizó sal marina de la marca *Sera salt (SERA PREMIUM)*, libre de nitratos, fosfatos y silicatos

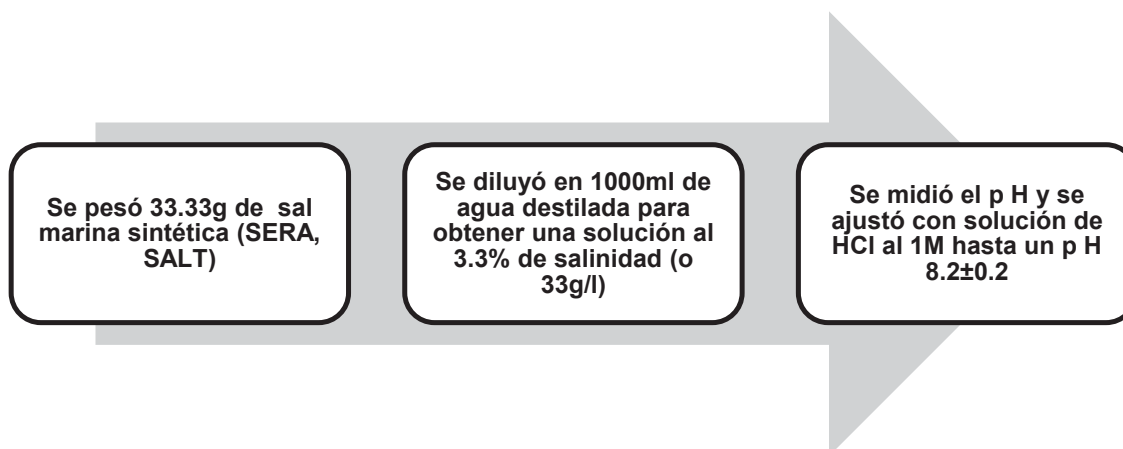


Diagrama 9. Preparación del agua de mar sintética para el cultivo de *Artemia franciscana*

4.1.1 Organismo de prueba

Los ensayos se realizaron con quistes de *Artemia franciscana* de Salt Creek (Salt creek, Inc), producto de E.U.A que garantizan un mínimo de 260.000 huevos/g. A partir de los quistes se obtuvieron poblaciones homogéneas de nauplios (90% eclosión), con un tamaño de 500-525 μm .

4.1.2 Obtención de los nauplios de *Artemia franciscana*

Para la obtención de nauplios se pesaron 0.1 g de quistes de *A. franciscana* se incubaron durante 24h en 150ml de agua marina sintética en artemiero con oxigenación constante-saturada mediante bomba de aireación manteniendo los siguientes parámetros en baño térmico:

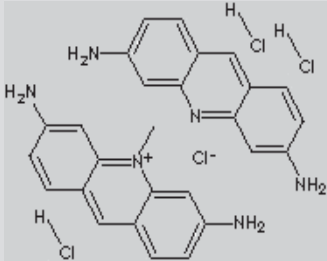
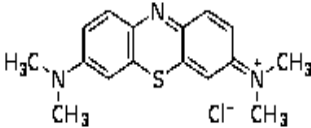
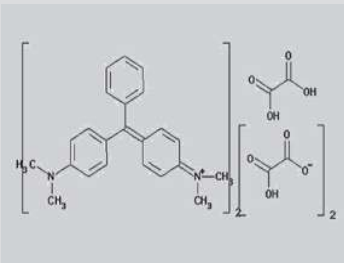
Tabla 13. Parámetros seguidos para una óptima eclosión de nauplios de *Artemia franciscana*.

PARÁMETRO	CONDICIONES
pH	8.2±0.2
SALINIDAD	33-35% (33-35g/l)
TEMPERATURA	27-30°C (baño térmico)
LUZ	1000 lux

4.1.3 Colorantes orgánicos

Los colorantes utilizados fueron de grado analítico, por lo que no se necesitó de purificación para cada uno de los colorantes. Para la realización de los ensayos de toxicidad (CL₅₀), se prepararon soluciones patrón a 10ml (10,000μl) con agua destilada empleando tubos de ensaye, cuidando de colocarlos en ambiente de oscuridad para evitar su fotodegradación, en la siguiente tabla se muestran (Tabla 14) las características, clasificación y No. De CAS de cada uno de los colorantes empleados:

Tabla 14. Colorantes y concentraciones empleados

COLORANTE	ESTRUCTURA MOLECULAR	CONCENTRACIONES UTILIZADAS EN ORDEN CRECIENTE PARA EL BIOENSAYO A LAS 24, 48 Y 72H DE EXPOSICIÓN (mg/l)	CLASIFICACIÓN DEL COLORANTE	No. CAS FÓRMULA QUÍMICA PESO MOLECULAR SOLUBILIDAD
Clorhidrato de Acriflavina (3, 6-diamino-10-methylacridinium hidroclorehidrato* Euflavine)		0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.035, 0.040, 0.045, 0.050, 0.055, 0.060, 0.065, 0.070, 0.075, 0.080, 0.085, 0.090, 0.095, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/L	ACRIDINA ÁCIDO*	(C ₂₇ H ₂₆ Cl ₂ N ₆) 8063-24-9 Obtenido de Sigma-Aldrich 259.7 g/mol 250-300 g/l (20°C)
Azul de Metileno (3,7-bis(dimetilamino)-Cloruro de fenazationio)		0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 mg/L	TIAZINA CATIÓNICO BÁSICO	(C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S) 61-73-4 Obtenido de Sigma-Aldrich 319,85 g/mol (20 °C) ~ 50 g/l
Oxalato de Verde de Malaquita N - [4 - [[4 - (dimetilamino - fenil] fenilmetilén] -2,5-ciclohexadien-1-ilideno]-N-metil-, etanodioato)		0.000030, 0.000050, 0.000070, 0.000090, 0.00010, 0.00030, 0.00050, 0.00070, 0.00090, 0.0010, 0.0030, 0.0050, 0.0070, 0.0090, 0.010, 0.030 mg/L	TRIFENILMETANO CATIÓNICO ÁCIDO	(C ₄₈ H ₅₀ N ₄ O ₄ 2H ₂ C ₂ O ₄) 2437-29-8 Obtenido de Golden Bell 927.03g/mol 110 g/l (24 °C)

4.1.4 Determinación de la toxicidad aguda del Azul de metileno, Clorhidrato de Acriflavina y Oxalato Verde de Malaquita en nauplios de *Artemia franciscana*

El ensayo letal 50 (LC_{50}) se realizó siguiendo la metodología propuesta por Vanhaecke & Persoone (1981) la cual se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte del 50% de nauplios de *Artemia* en 24 h. Se inició con la incubación de los quistes de *Artemia franciscana*, en agua de mar sintética con los parámetros descritos en la Tabla 13. Se prepararon soluciones patrón de cada uno de los colorantes utilizados, descritos en la Tabla 14. En placas multipocillo de 24 pocillos, los nauplios obtenidos de 24h, fueron distribuidos en cajas Petri estériles para la contabilización posterior de 10 nauplios ($n=10$) en cada pocillo utilizando una pipeta Pasteur estéril graduada a 970 μ l. Se realizaron los bioensayos sobre las placas multipocillo con los 10 nauplios en cada pocillo, utilizando alícuotas de 30 μ l de las soluciones patrón de cada colorante para la obtención final de 1000 μ l en cada pocillo utilizando concentraciones de forma creciente con cuatro repeticiones cada una, dejando la columna A como control. Posterior a la exposición, la incubación se realizó en ambiente de oscuridad, manteniendo humedad, en temperatura media de 25°C y durante un periodo de exposición a cada uno de los xenobióticos de: 24h, 48h y 72h. (Toxicidad aguda). Una vez transcurrido este tiempo, se pasó a la lectura de cada una de las placas de ensayo, contabilizando el número de nauplios vivos y muertos de *Artemia franciscana* en cada uno de los pocillos de cada concentración. La muerte (respuesta) de los nauplios se estableció por la falta total de movimientos tanto interno como externo durante 10 seg. de observación bajo el estéreo microscopio.

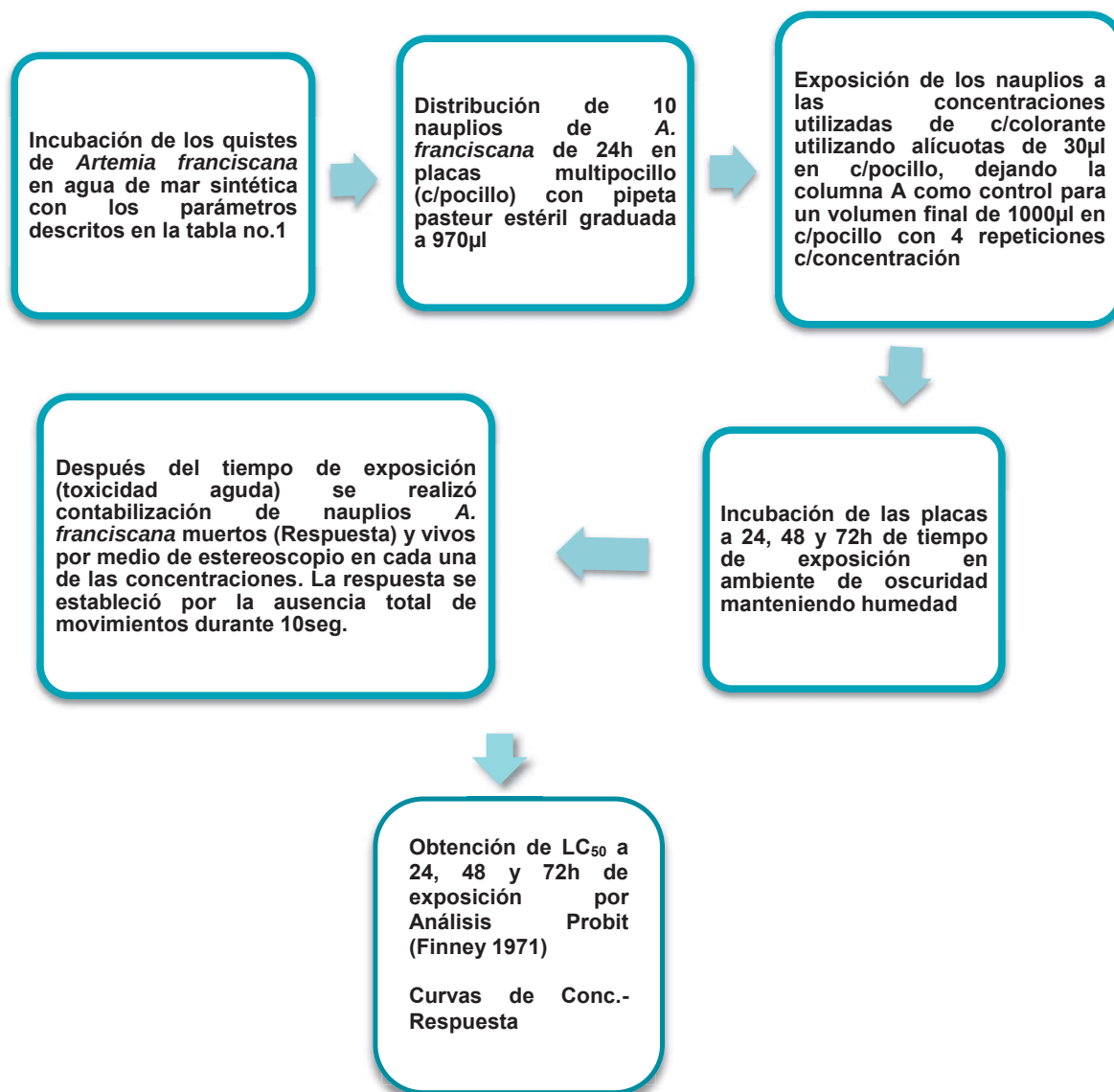


Diagrama 10. Metodología de los ensayos de toxicidad para la obtención de LC₅₀ a 24, 48 y 72h de los 3 colorantes empleados.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de las LC_{50} 24, 48 y 72h en cada bioensayo fueron obtenidos, primero realizando un análisis por medio de Curvas Concentración-Respuesta (curva sigmoidea) calculando los logaritmos de las concentraciones finales, relacionados con el porcentaje de mortalidad (% mortalidad vs Log Concentración). La respuesta de Mortalidad de cada concentración, se expresa a través del Teorema de Tchebysheff:

$$\mu \pm k\sigma$$

Donde:

μ =Media

k = cualquier valor mayor que 1 (Se utilizó $k=2$ de acuerdo a la regla empírica para Distribución Normal en la cual aproximadamente el 95% de los datos de mortalidad deben estar dentro de la desviación estándar con respecto de la media de cada una de las concentraciones utilizadas de los respectivos colorantes).

σ = Desviación estándar

Finalmente las LC_{50} de cada colorante se obtuvieron por medio del modelo de **Análisis Probit** (Finney, 1971), el cual convierte el porcentaje de mortalidad de cada concentración de colorante a Unidades Probit y las concentraciones en logaritmos, con el objetivo de obtener una regresión de tipo lineal y su correspondiente coeficiente de correlación. El **Método de Mínimos Cuadrados** se utilizó para el ajuste de curva y disminución del error. (Distribución Normal), el nivel de intervalo de confianza fue de $\alpha=0.05$ (95%), seguido por la aplicación del **ANOVA** para comparar la sensibilidad en los tres diferentes estadíos de la *Artemia franciscana*. Se empleó el paquete estadístico BioStat Professional 5.8.1.0 Versión 2009 para graficar resultados.

6. RESULTADOS

RESULTADOS

Se valoró la toxicidad aguda a 24, 48 y 72h de exposición de los colorantes **Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno y Oxalato de Verde de Malaquita** sobre nauplios de *Artemia franciscana* mediante la determinación de la respuesta LC_{50} de cada colorante ensayado, con cuatro repeticiones de cada concentración.

6.1. Clorhidrato de Acriflavina

Se observó que para el **Clorhidrato de Acriflavina**, la respuesta de LC_{50} a 24h sobre nauplios de *Artemia franciscana* fue de **0.2197mg/l**. En la siguiente Tabla 15 se muestran los valores obtenidos de LC_{50} con sus respectivos límites de confianza del 95% así como las Concentraciones Letales al 10% y 90% del colorante:

Tabla 15. Valores de LC_{50} A 24h del Clorhidrato de Acriflavina y sus límites de confianza 95%.

LC_{50} (24H)	0.2197mg/l
Límites de confianza 95% de LC_{50}	0.2181-0.2214
LC_{10}	0.1873mg/l
LC_{90}	0.2522mg/l

La curva de Concentración-Respuesta a 24h del Clorhidrato de Acriflavina se obtuvo mediante la conversión de las concentraciones utilizadas a logaritmo y, la respuesta se representa en por ciento de Mortalidad, en el gráfico 1 se presenta la curva Concentración-Respuesta:



Gráfico 11. Curva Concentración-Respuesta del Clorhidrato de Acriflavina a 24h de exposición en nauplios de *Artemia franciscana*.

En el análisis Probit se obtuvo un coeficiente de correlación lineal, mostrándose en el Gráfico 2:

$$r = 0.96$$

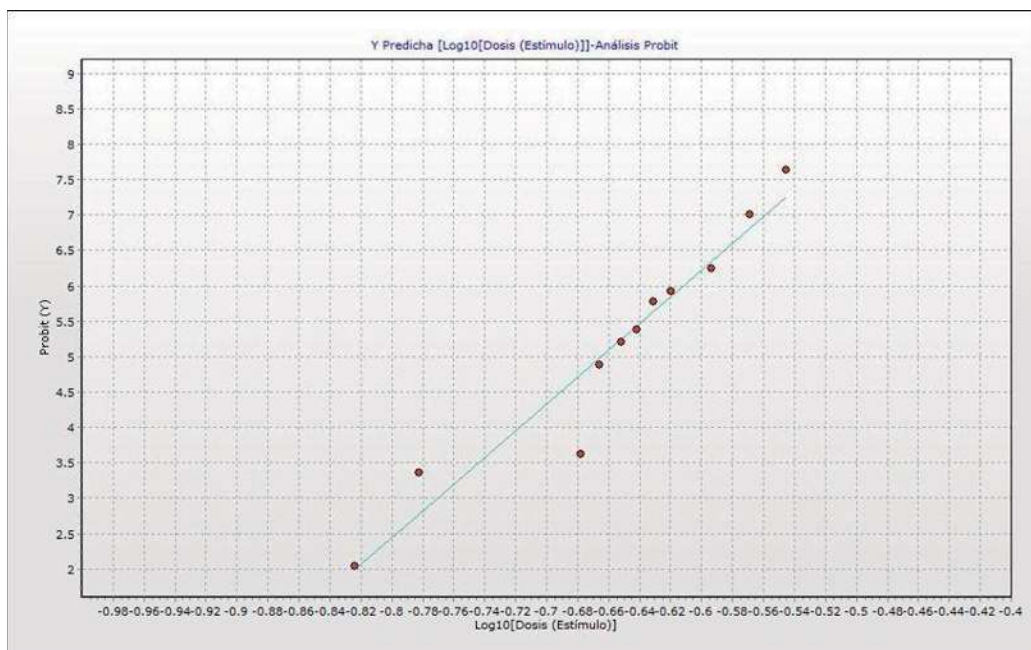


Gráfico 12. Análisis Probit del Clorhidrato de Acriflavina a 24h.

A 48h de exposición del Clorhidrato de Acriflavina se obtuvo una LC_{50} de **0.2319mg/l**, con escasa diferencia estadística al valor de la LC_{50} de 24h, se presentan en la Tabla 16:

Tabla 16. Valores de LC_{50} a 48h de exposición de Clorhidrato de Acriflavina y límites de confianza del 95%.

LC_{50} (48H)	0.2319mg/l
Límites de confianza 95% de LC_{50}	0.2261-0.2378
LC_{10}	0.1121mg/l
LC_{90}	0.35191mg/l

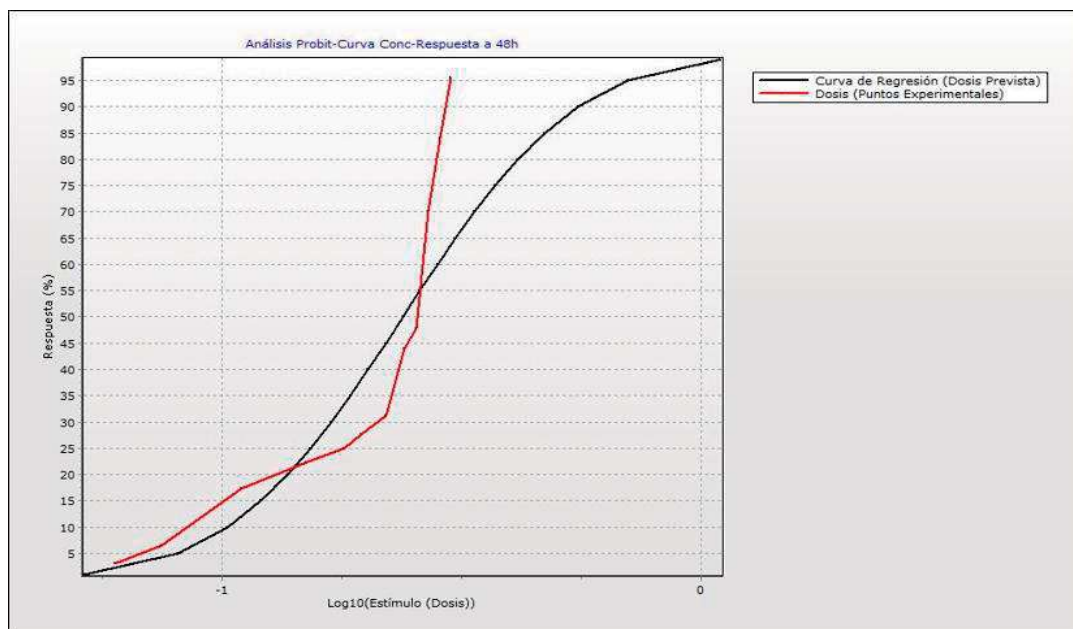


Gráfico 13. Curva de Concentración-Respuesta del Clorhidrato de Acriflavina a 48h de exposición en nauplios de *Artemia franciscana*.

En el análisis Probit se obtuvo un coeficiente de correlación lineal y el siguiente gráfico (Gráfico 4):

$$r = 0.88$$

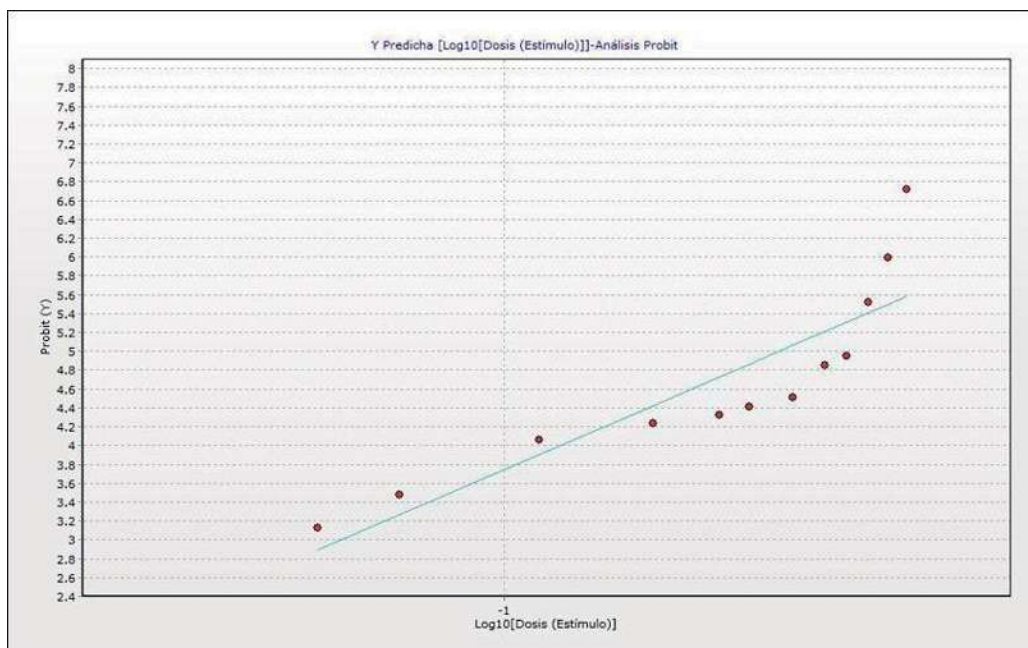


Gráfico 14. Análisis Probit a 48H de exposición del Clorhidrato de Acriflavina

A las 72h de exposición del Clorhidrato de Acriflavina se obtuvo una LC_{50} de **0.01406mg/l** sobre nauplios de *Artemia franciscana* estadísticamente diferente a los valores de LC_{50} obtenidos de 24 y 48h de exposición al xenobiótico, los resultados a este tiempo se muestran en la Tabla 17:

Tabla 17. Valores de LC_{50} del Clorhidrato de Acriflavina y límites de confianza del 95% sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

LC_{50} (72H)	0.01406mg/l
Límites de confianza del 95% de LC_{50}	0.01330-0.01483
LC_{10}	0.00190mg/l
LC_{90}	0.02623mg/l

Para la relación de Concentración-Respuesta se obtuvo la siguiente curva (Gráfico 5):

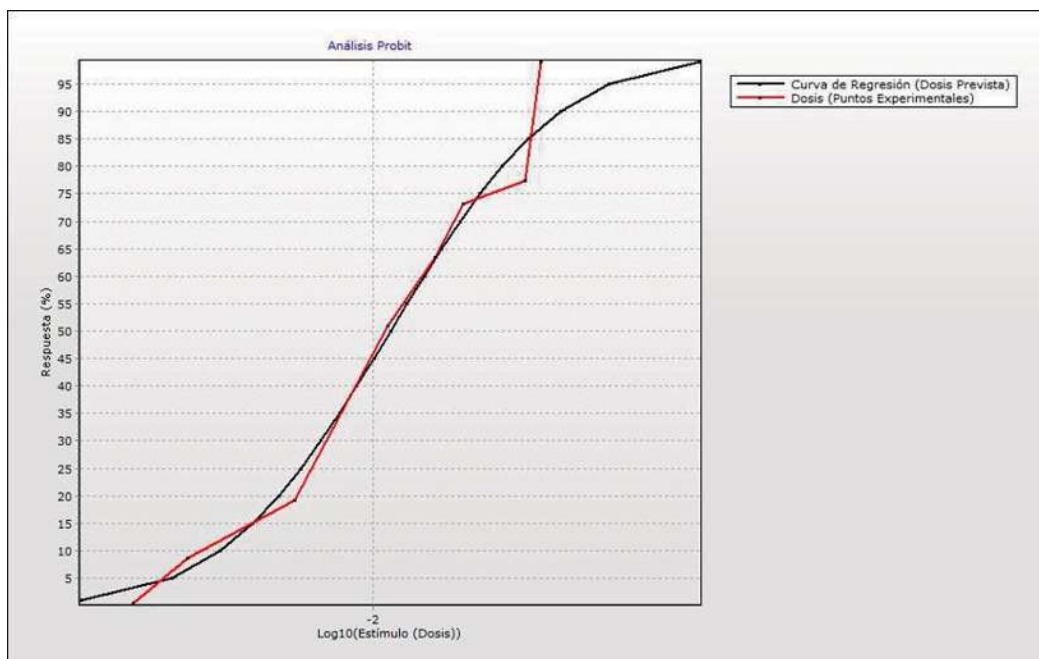


Gráfico 15. Curva de Concentración-Respuesta a 72h del Clorhidrato de Acriflavina.

Con un coeficiente de correlación lineal de y el Gráfico 6:

$$r = 0.95$$

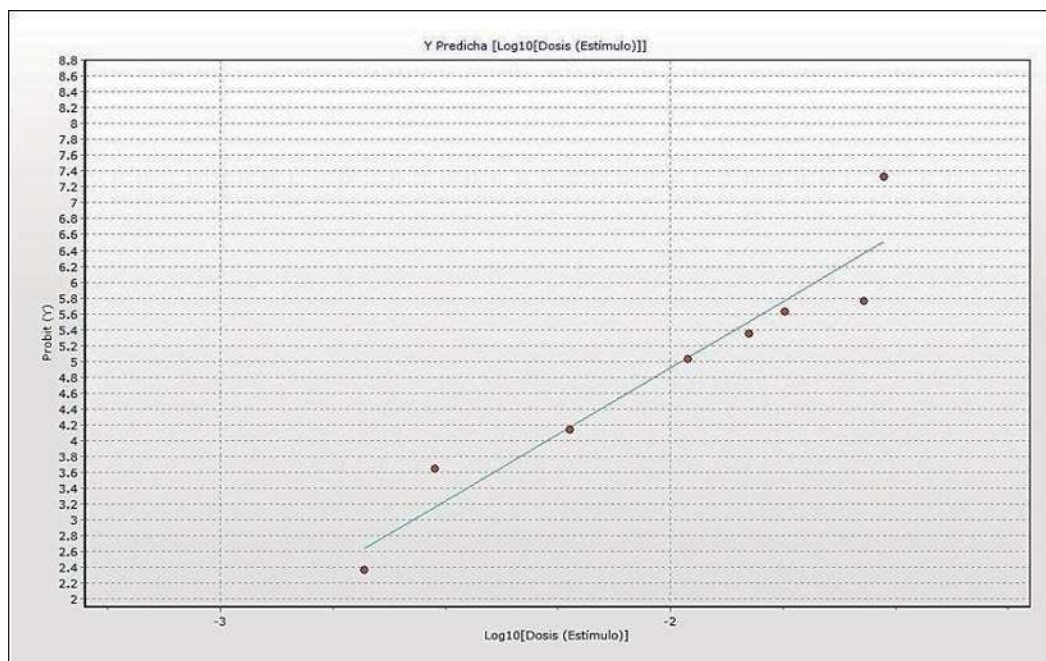


Gráfico 16. Análisis Probit a 72h del Clorhidrato de Acrilavina

A 24h y 48h de exposición al Clorhidrato de Acrilavina existió diferencia significativa ($F= 121.3$ $p<0.05 = 0.0000016_{24h}$, $F=33.1$ $p<0.05= 0.00018_{48h}$) con respecto a 72h de exposición ($F= 62.8$ $p<0.05= 0.00021$), es decir, presentó mayor sensibilidad en el estadio de 72h que a las 24 y 48h de *Artemia franciscana*. ($p<0.05$).

6.1.2 Azul de Metileno

Para el **Azul de Metileno** se obtuvo una LC_{50} a 24h de **1.2575mg/l**, en la Tabla 18 se muestra la $LC_{50(24h)}$, sus respectivos límites de confianza del 95% y la respuesta de mortalidad al 10% y 90%:

Tabla 18. Valores de LC_{50} del Azul de Metileno a 24h con sus respectivos límites de confianza del 95%.

LC_{50} (24H)	1.2575mg/l
Límites de confianza del 95% de LC_{50}	1.2289-1.2859
LC_{10}	0.7512mg/l
LC_{90}	1.7637mg/l

En la curva de Concentración-Respuesta de exposición se obtuvo el siguiente gráfico (Gráfico 7):

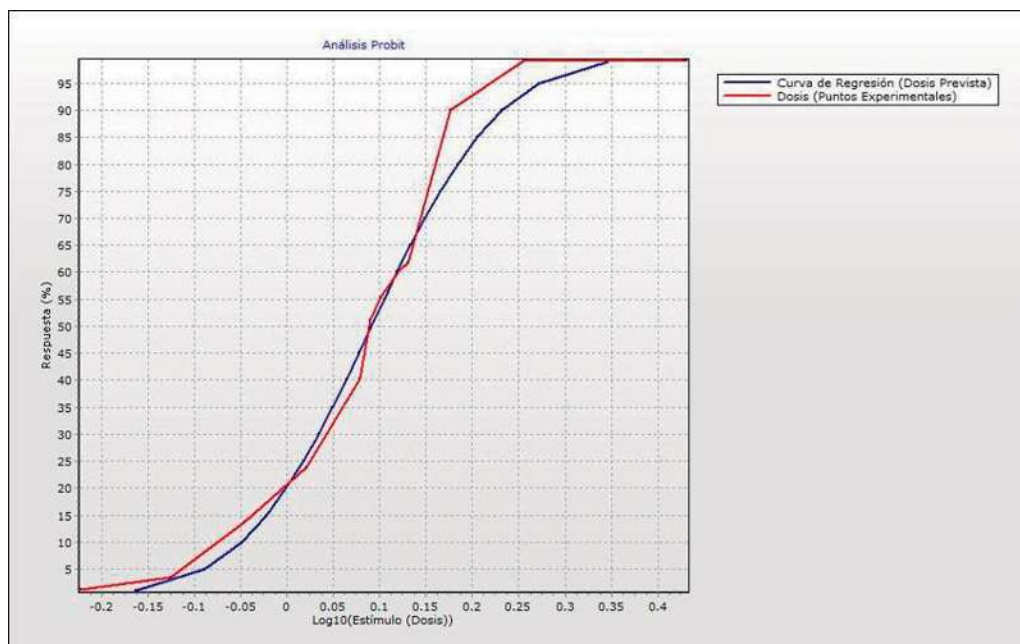


Gráfico 17. Curva Concentración-Respuesta del Azul de Metileno a 24H de exposición en nauplios de *Artemia franciscana*.

Con respecto al análisis Probit, en la regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación de y el Gráfico 8:

$$r = 0.97$$

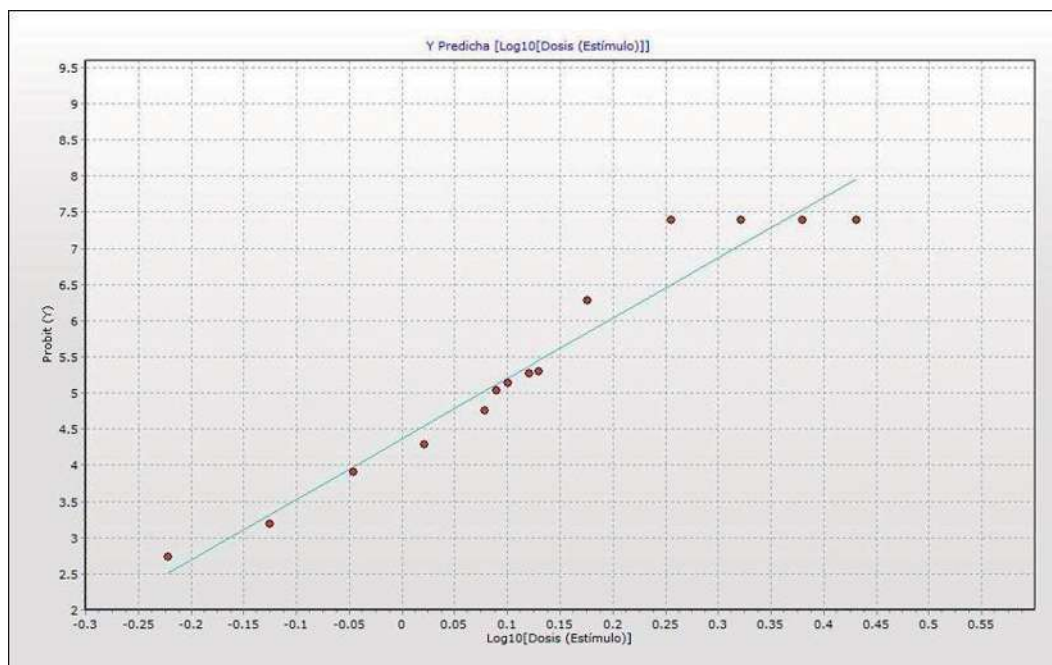


Gráfico 18. Análisis Probit del Azul de Metileno a 24h de exposición.

A 48h de exposición se obtuvo una LC_{50} de **0.6557mg/l**, estadísticamente diferente al obtenido a 24h, los resultados se muestran en la Tabla 19:

Tabla 19. Valores de LC_{50} a 48h de exposición del Azul de Metileno y límites de confianza del 95%.

LC_{50}	0.6557mg/l
Límites de confianza del 95% de LC_{50}	0.6298-0.6817
LC_{10}	0.3686mg/l
LC_{90}	0.9429mg/l

En el análisis de Concentración-Respuesta a 48h se obtuvo la siguiente curva (Gráfico 9):

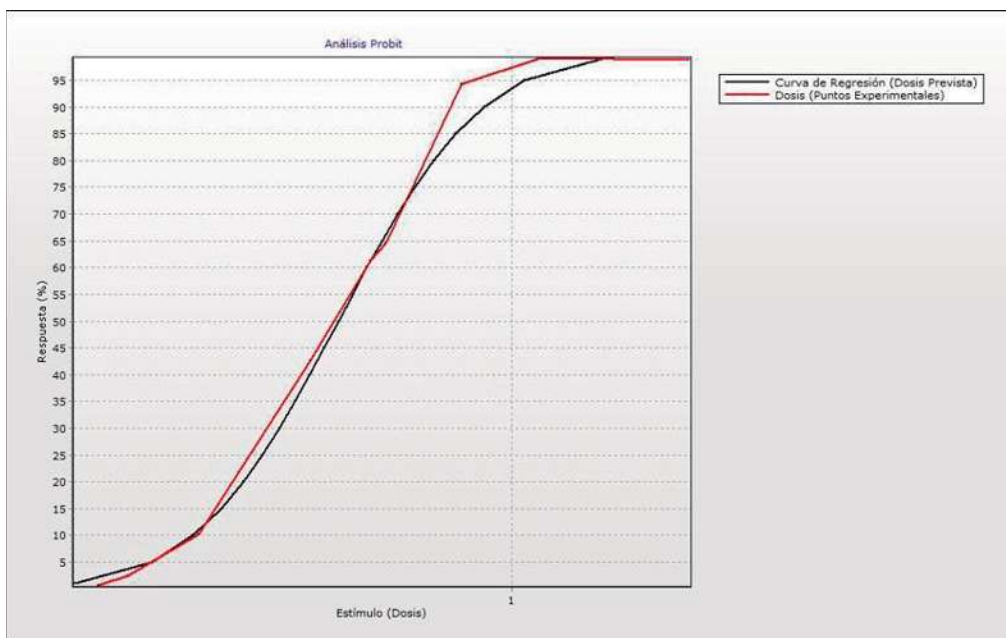
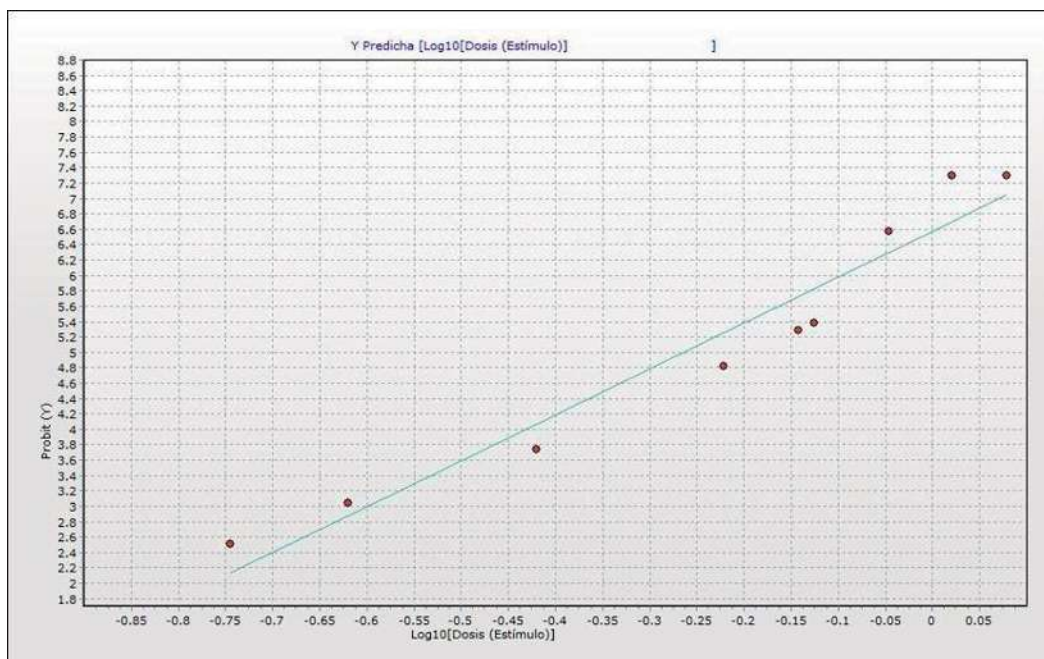


Gráfico 19. Curva Concentración-Respuesta a 48h del Azul de Metileno.

Para el análisis Probit se consiguió un coeficiente de correlación lineal y el Gráfico 10:

$$r = 0.97$$



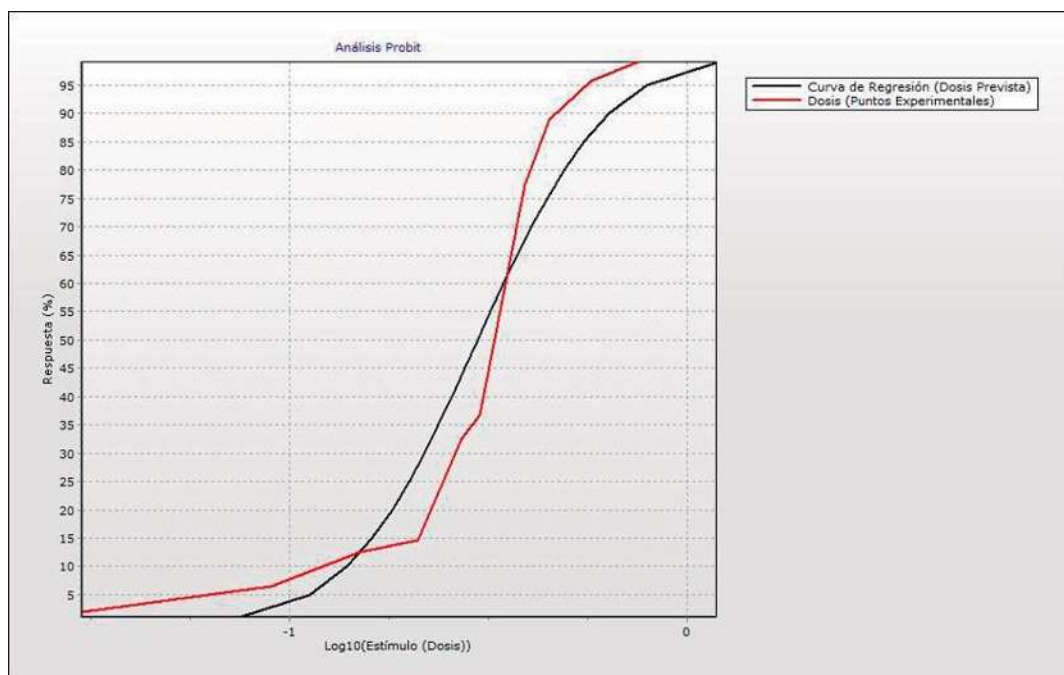
Gráfica 20. Análisis Probit del Azul de Metileno a 48H.

A 72H de exposición del Azul de Metileno se determinó la LC_{50} que fue de **0.3241mg/l**, en la Tabla 20 se muestran los respectivos Límites de Confianza al 95%:

Tabla 20. Valores de LC_{50} a 72H del Azul de Metileno y límites de confianza del 95%.

LC_{50} (72H)	0.3241mg/l
Límites de confianza del 95% de LC_{50}	0.3122-0.3359mg/l
LC_{10}	0.1401mg/l
LC_{90}	0.5080mg/l

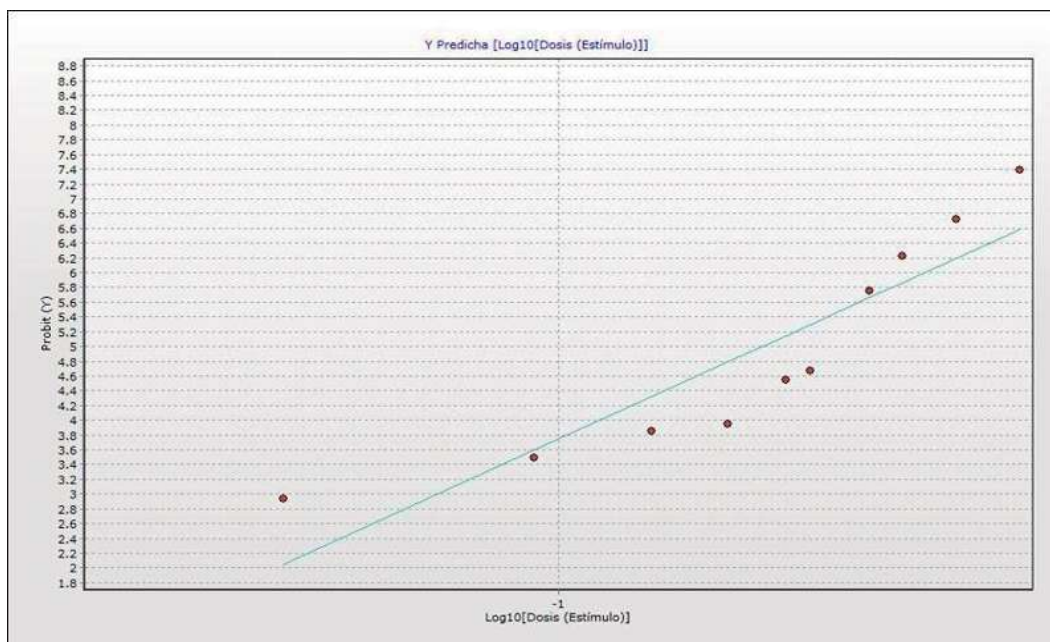
Obteniéndose la siguiente curva de Concentración-Respuesta a 72h (Gráfico 11):



Gráfica 21. Curva Concentración-Respuesta a 72h del Azul de Metileno.

En el análisis Probit se obtuvo la siguiente gráfica (Gráfico 12), con un coeficiente de correlación lineal de:

$$r = 0.91$$



Gráfica 22. Análisis Probit del Azul de Metileno a 72H.

A 24h y 48h de exposición al Azul de Metileno existió diferencia significativa ($F=219.2$ $p<0.05$ $=0$ 24h, $F=88.9$ $p<0.05=0.0002_{48h}$) con respecto a 72h de exposición ($F=37.3$ $p<0.05=0.0003$), es decir, presenta mayor sensibilidad al estado de 72h de *Artemia franciscana* que a las 24 y 48h. ($p<0.05$).

6.1.3 Oxalato de Verde Malaquita

Para el **Oxalato de Verde de Malaquita** a 24h de exposición en nauplios de *Artemia franciscana* se obtuvo una LC_{50} de **0.00695mg/l**, en la Tabla 21 se muestra la LC_{50} con sus respectivos límites de confianza del 95% así como las concentraciones letales al 10 y 90%:

Tabla 21. Valores de LC_{50} a 24h del Oxalato de Verde de Malaquita y límites de confianza del 95% sobre nauplios de *Artemia franciscana*

LC_{50} (24H)	0.00695mg/l
Límites de confianza del 95% de LC_{50}	0.00679-0.00711
LC_{10}	0.00376mg/l
LC_{90}	0.01013mg/l

En la relación Concentración-Respuesta se obtuvo el siguiente gráfico (Gráfico 13):

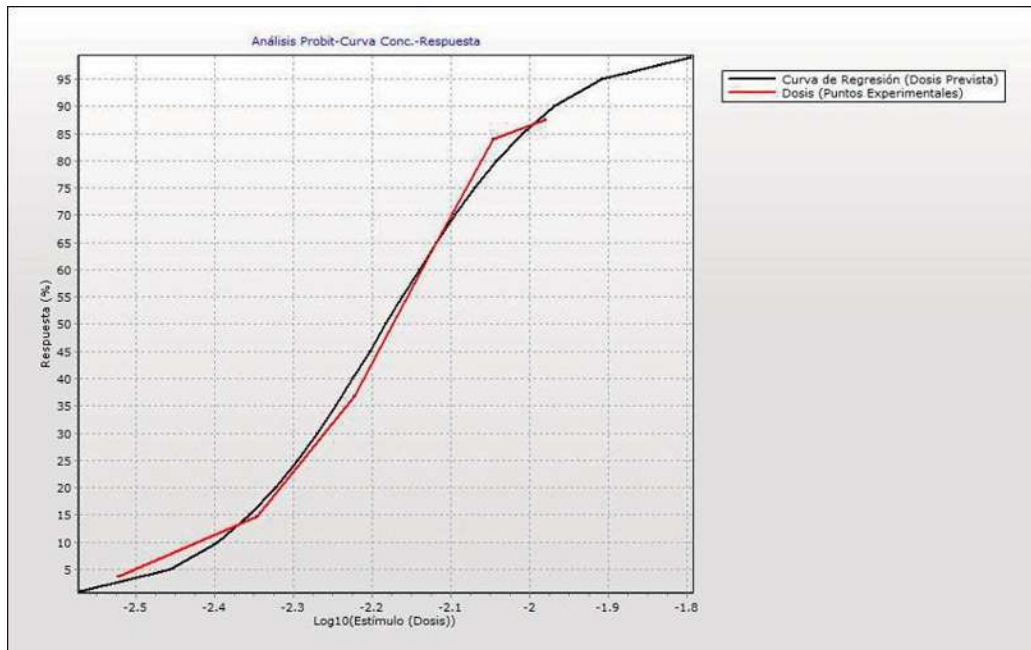


Gráfico 23. Curva Concentración-Respuesta del Oxalato de Verde Malaquita a 24h de exposición en nauplios de *Artemia franciscana*.

En el análisis Probit, se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de Pearson y la siguiente gráfica (Gráfico 14) de regresión lineal:

$$r = 0.993$$

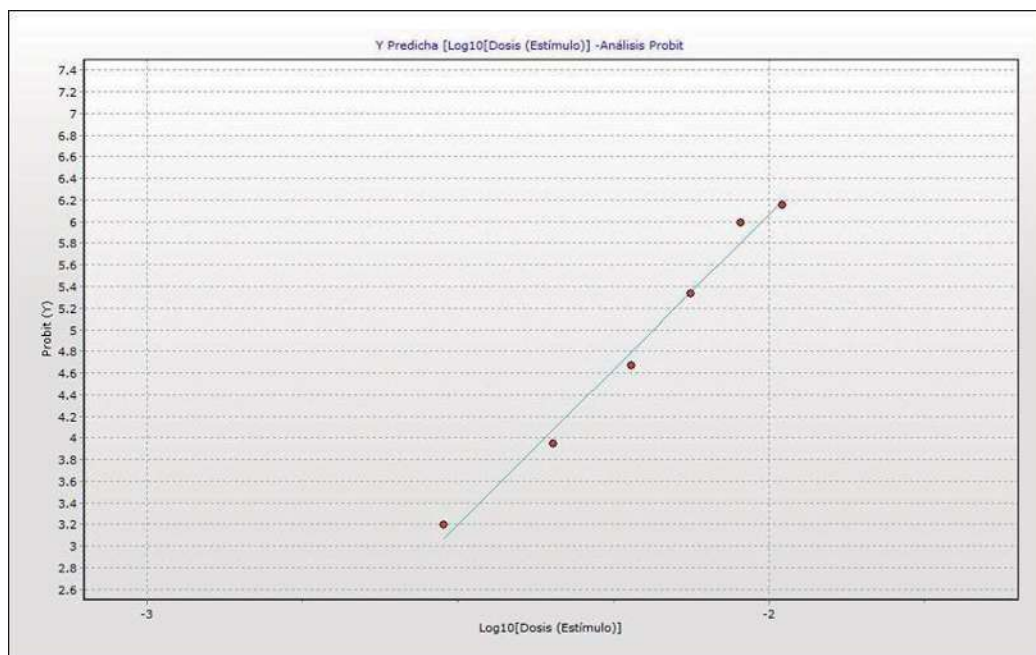


Gráfico24. Análisis Probit del Oxalato de Verde Malaquita a 24H.

En el bioensayo a 48h se obtuvo una LC_{50} de **0.00319mg/l**, en la Tabla 22 se muestra la LC_{50} , sus límites de confianza del 95% y sus respectivos LC_{10} y $LC_{90\%}$:

Tabla 22. Valores de LC_{50} del Oxalato de Verde Malaquita a 48H y respectivos $LC_{95\%}$.

LC_{50} (48H)	0.00319mg/l
Límites de confianza del 95% de LC_{50}	0.00287-0.00351
LC_{10}	0.00110mg/l
LC_{90}	0.00748mg/l

En la relación Concentración-Respuesta se obtuvo la siguiente curva (Gráfico 15):

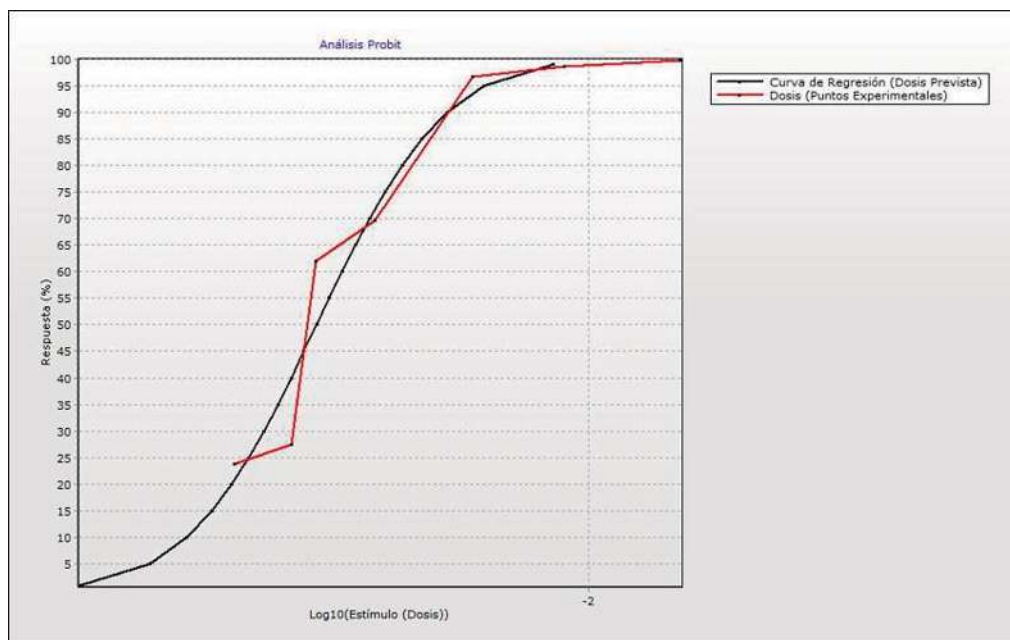


Gráfico 25. Curva Concentración-Respuesta del Oxalato de Verde Malaquita a 48h de exposición en naulios de *Artemia franciscana*.

En el análisis Probit se obtuvo el siguiente coeficiente de correlación lineal y su respectiva regresión lineal (Gráfico 16)

$$r = 0.963$$

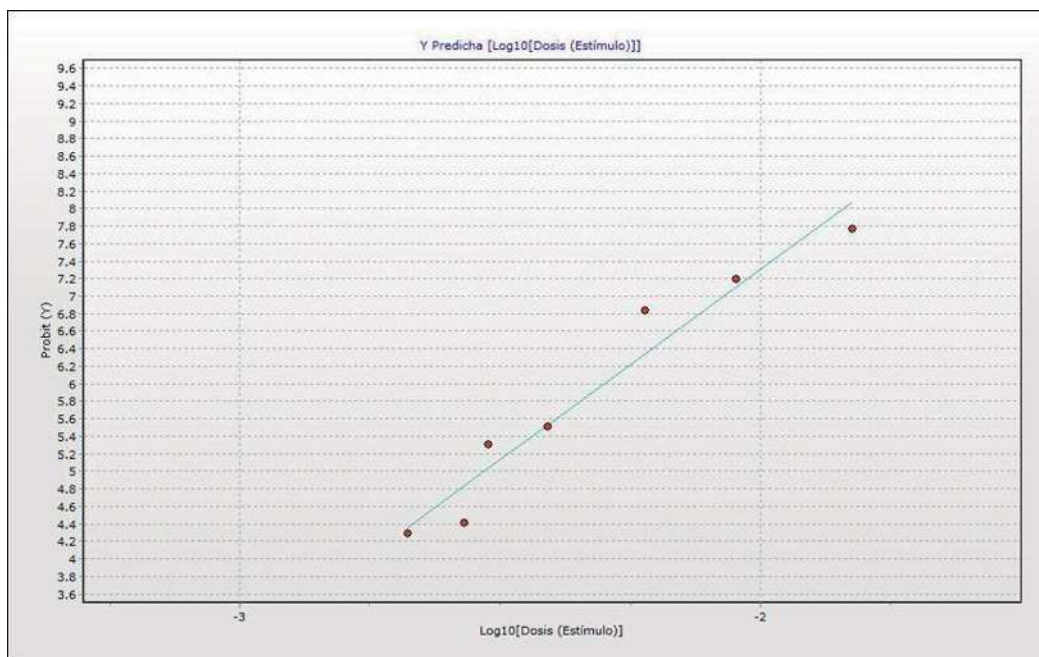


Gráfico 26. Análisis Probit del Oxalato de Verde Malaquita a 48h de exposición.

Para el bioensayo a 72h del Oxalato de Verde Malaquita se obtuvo una LC_{50} de **0.000223mg/l**, mostrando también los límites de confianza al 95% y las LC_{10} y LC_{90} en la Tabla 23:

Tabla 23. Valores de LC_{50} a 72H del Oxalato de Verde Malaquita y límites de confianza del 95%.

LC_{50} (72H)	0.000223 mg/l
Límites de confianza del 95% LC_{50}	0.000213-0.000234
LC_{10}	0.0000375 mg/l
LC_{90}	0.000409 mg/l

En la relación Concentración-Respuesta se obtuvo el siguiente gráfico (Gráfico 17):

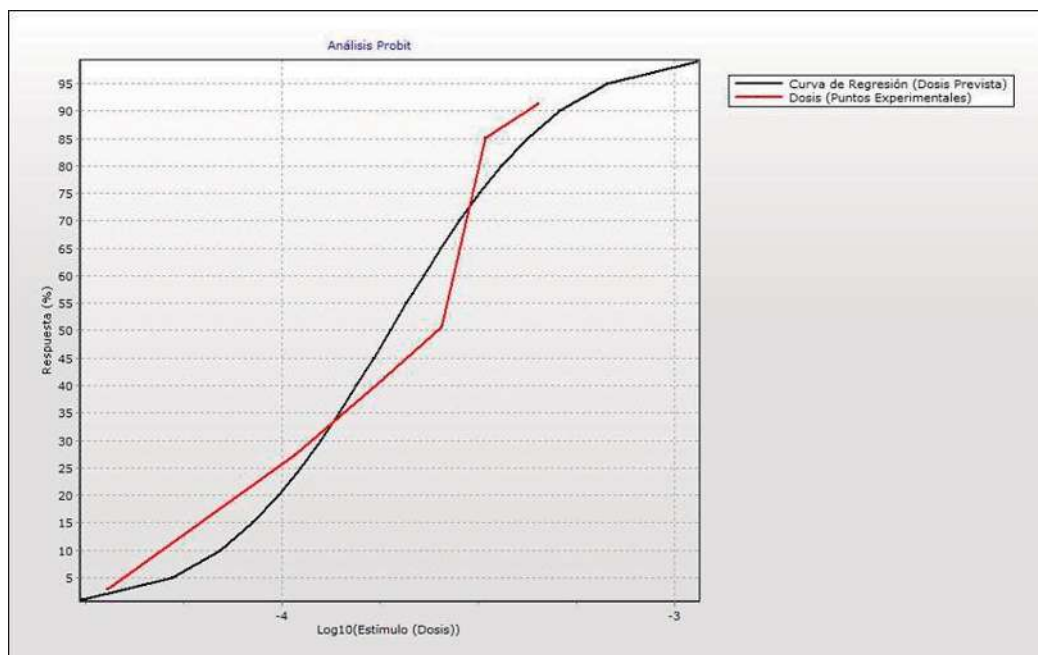


Gráfico 27. Relación Concentración-Efecto del Oxalato de Verde Malaquita a 72H de exposición sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

En el análisis Probit se consiguió la siguiente regresión lineal así como su coeficiente de correlación:

$$r = 0.973$$

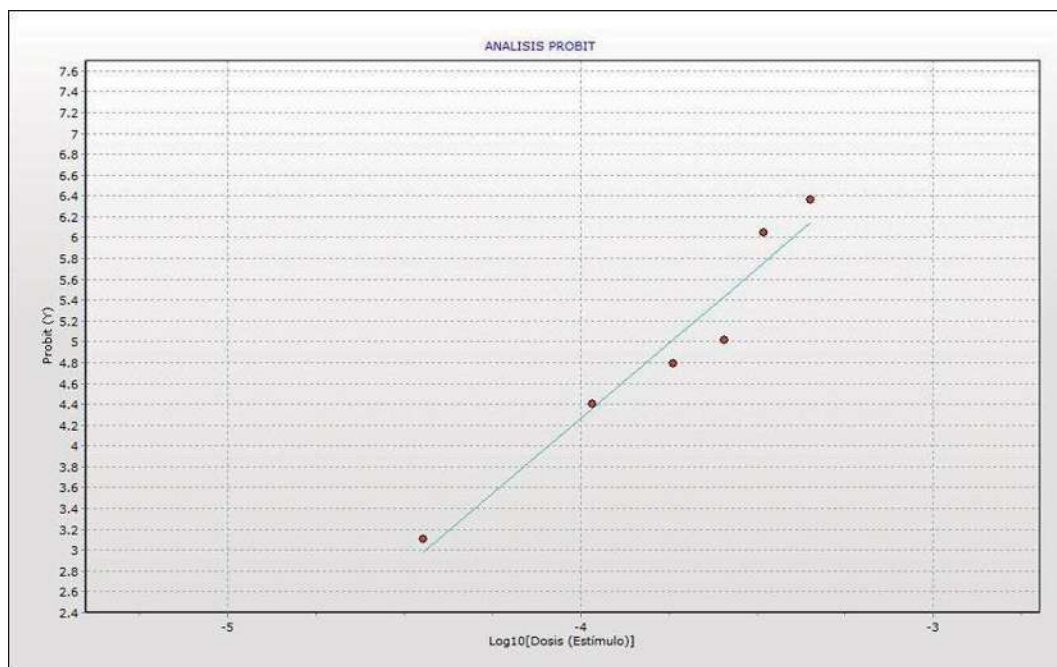


Gráfico 28. Análisis Probit del Oxalato de Verde Malaquita a 72H.

A 24h y 48h de exposición al Oxalato de Verde de Malaquita existe diferencia significativa ($F=309.7$ $p<0.05 = 0.000061$ $_{24h}$, $F= 76.2$ $p<0.05=0.0001$ $_{48h}$) con respecto a 72h de exposición ($F= 70.7$ $p<0.05= 0.001$) sobre *Artemia franciscana*, es decir, presenta mayor sensibilidad a las 72h que a 24 y 48h. ($p<0.05$), sin embargo también existe diferencia entre las 24 y 48h así como 48 y 72h.

Los resultados obtenidos tras la exposición de larvas de *Artemia*, a los tiempos de desarrollo larvario correspondientes a 24-, 48- y 72 horas de vida, se presentan resumidos en la Tabla 24:

Tabla 24. Valores de Concentración Letal 50 (CL₅₀), con sus correspondientes Límites de Confianza al 95 % (LC 95 %), obtenidos para cada uno de los compuestos colorantes ensayados, sobre larvas de *Artemia franciscana* de 24-, 48- y 72 horas de vida.

COLORANTE	LC ₅₀ 24H (LC95%)	LC ₅₀ 48H (LC95%)	LC ₅₀ 72H (LC95%)	LC ₁₀ Y LC ₉₀
Clorhidrato de Acriflavina	0.2197mg/l	0.2319mg/l	0.0141mg/l	24H 0.1873-0.2522
				48H 0.1120-0.3519
	(0.2181-0.2214)	(0.2035-0.3085)	(0.0133-0.0148)	72H 0.0019-0.0262
Azul de Metileno	1.2574mg/l	0.6557mg/l	0.3241mg/l	24H 0.7512-1.7637
				48H 0.3686-0.9429
	(1.2289-1.2859)	(0.6298-0.6817)	(0.3122-0.3359)	72H 0.1401-0.5080
Oxalato de Verde Malaquita	0.0069mg/l	0.0032mg/l	0.00022mg/l	24H 0.0037-0.0101
				48H 0.0011-0.0074
	(0.0067-0.0071)	(0.0028-0.0035)	(0.00021- 0.00023)	72H 0.0000375- 0.000409

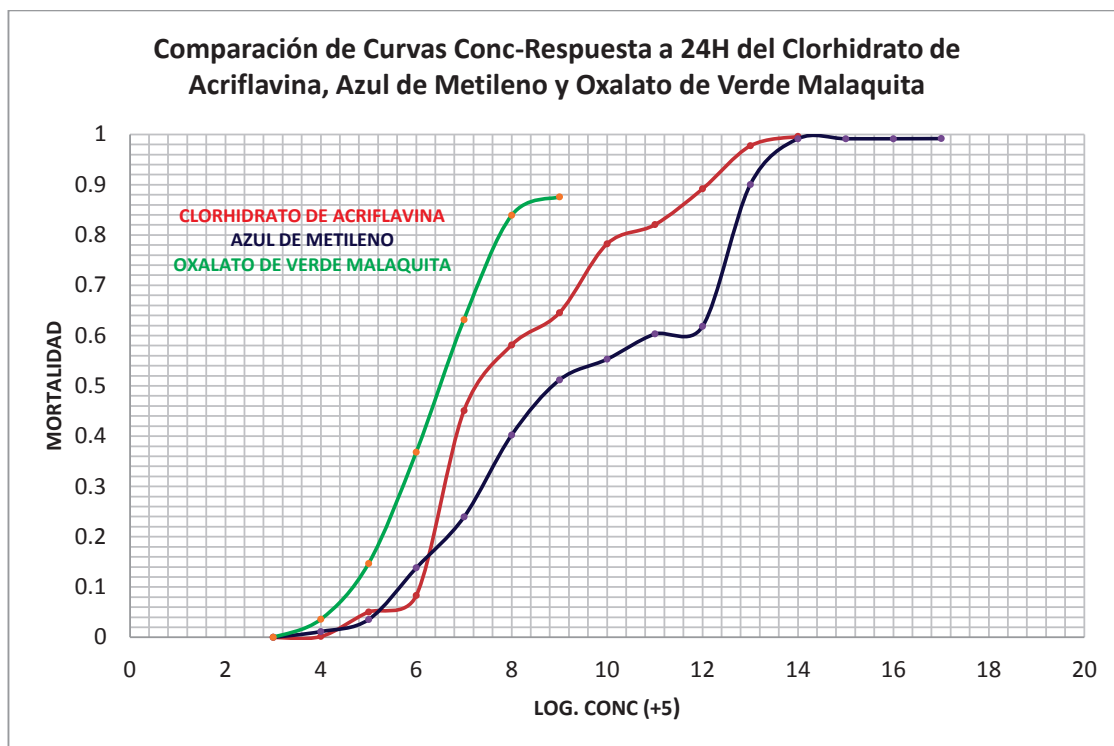


Gráfico 29. Comparación de Curvas Concentración-Respuesta a 24H del Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno y Oxalato de Verde Malaquita

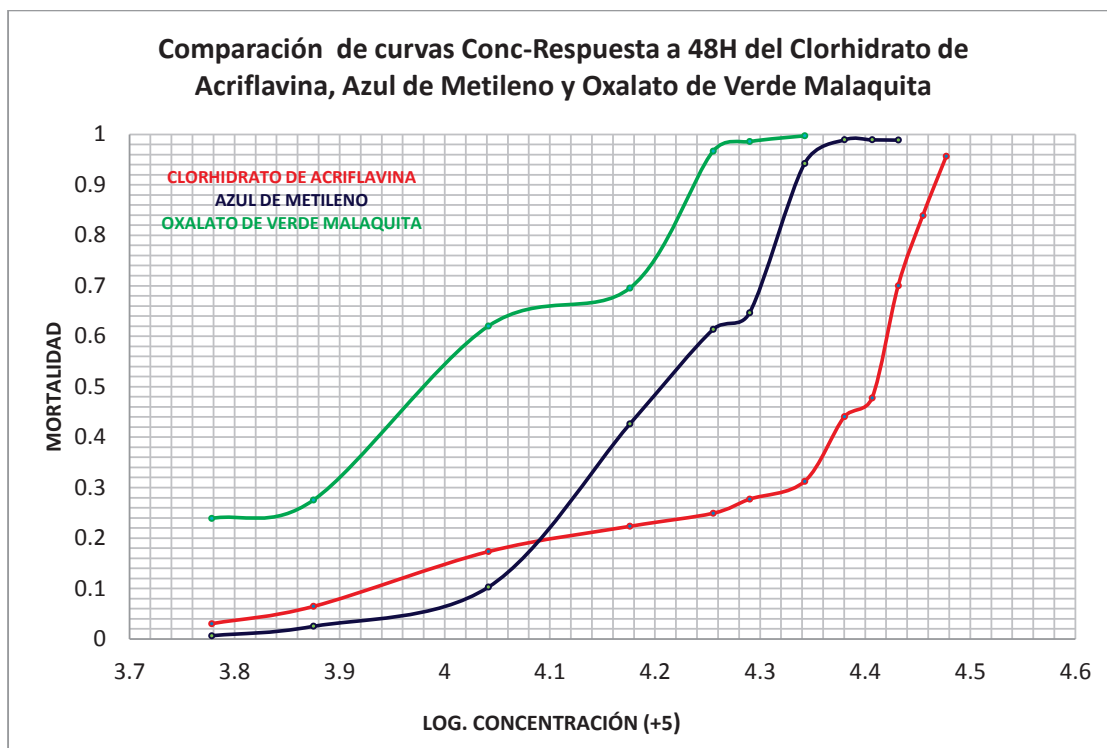


Gráfico 30. Comparación de Curvas Concentración-Respuesta a 48H del Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno y Oxalato de Verde Malaquita.

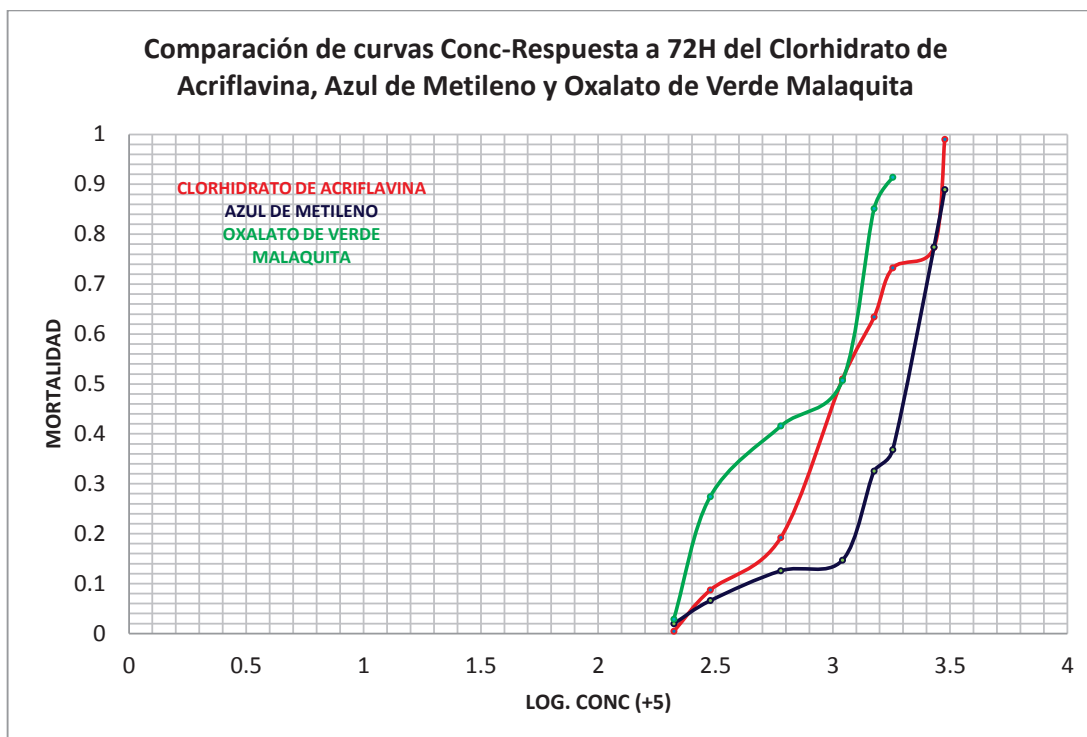


Gráfico 31. Comparación de Curvas de Concentración-Respuesta a 72H del Clorhidrato de Acriflavina, Azul de Metileno y Oxalato de Verde Malaquita.

El estudio de letalidad en cada uno de los compuestos activos ensayados revela que, tanto el oxalato de verde de malaquita como el azul de metileno y el clorhidrato de acriflavina se comportan como elementos tóxicos para los nauplios de *Artemia*. Los resultados obtenidos frente a la exposición sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida indican que el oxalato de verde de malaquita resultó ser el colorante más tóxico, con un valor para la CL_{50} de **0.0069mg/l** seguido de la Acriflavina CL_{50} de **0.2197mg/l** y del azul de metileno CL_{50} de **1.2574mg/l**. Como se muestra en la Tabla 24, comparando con las LC_{50} a cada tiempo de exposición 24h, 48h y 72h con los tres colorantes ensayados, el colorante que presentó mayor toxicidad de acuerdo a los resultados obtenidos fue el **Oxalato de Verde Malaquita**. Además, en cada una de las gráficas anteriores de curvas Concentración-Respuesta comparando a 24, 48 y 72h de exposición de los tres colorantes sobre nauplios de *Artemia franciscana*, la curva del colorante **Oxalato de Verde Malaquita** en los Gráficos 19, 20 y 21, se encuentra desviada hacia a la izquierda en los tres tiempos de exposición al xenobiótico, lo que indica que se necesita de menor concentración, para que el colorante presente una mayor toxicidad en el bioindicador utilizado.

Los resultados obtenidos con la exposición sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de vida no evidencian en cuanto al efecto letal de los compuestos ensayados que aparezcan diferencias estadísticamente significativas entre la $CL_{50(24)}$ y la $CL_{50(48)}$ correspondientes aunque sí se presentó una LC_{50} a 72h de Oxalato de Verde de Malaquita **0.00022mg/l**, estadísticamente diferente a los valores obtenidos en LC_{50} del Clorhidrato de Acriflavina **0.014mg/l**, y Azul de Metileno de **0.3241mg/l**. El mayor efecto letal provocado por el oxalato de verde de malaquita se continúa en los ensayos con larvas de *Artemia* de 72 horas de vida. El estudio comparativo de la sensibilidad de los tres estadíos larvarios utilizados aporta la evidencia del aumento de sensibilidad conforme se aumentó el grado de desarrollo larvario; las diferencias estadísticas son significativas para los valores obtenidos entre larvas de *Artemia* de 24 y 48 horas de vida, y entre los correspondientes a los estudios con larvas de *Artemia* de 48 y 72 horas de vida a excepción de una marcada diferencia estadísticamente significativa con el verde malaquita a las 72h donde la $LC_{50(72h)}$ es de **0.00022mg/l**.

Artemia franciscana a las 72h de exposición presentó una mayor sensibilidad en cada uno de los colorantes ensayados, es decir, existió una diferencia significativa con respecto a los estadíos de 24 y 48h. ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El uso de productos terapéuticos como antifúngicos, antibacterianos y antiprotozoarios en la acuicultura costera tiene el potencial de dar lugar a residuos químicos que aparecen en la fauna silvestre del entorno local. Los efectos toxicológicos en las especies no objetivo pueden estar asociados con el uso de tratamientos de baños químicos, así mismo las exposiciones químicas accidentales y el consumo posterior de productos acuícolas pueden presentar riesgos para la salud humana.

De acuerdo a los datos obtenidos de las CL_{50} a 72h de exposición a cada uno de los colorantes ensayados sobre nauplios de *A. franciscana*, se muestra que el colorante con una LC_{50} menor fue el Oxalato de Verde de Malaquita el cual mostró una LC_{50} de **0.000223mg/l**, es decir, fue el colorante que presentó mayor toxicidad a una concentración menor, seguido en respuesta de mortalidad por el Clorhidrato de Acriflavina con una LC_{50} de **0.01406mg/l** y por último al Azul de Metileno LC_{50} de **0.3241mg/l**, lo que sugiere que a mayor tiempo de exposición se necesita de una menor concentración para que cada uno de los colorantes presenten una mayor respuesta de letalidad. Además, *A. franciscana* presentó mayor sensibilidad a las 72h de exposición de cada xenobiótico tratado, lo cual está de acuerdo a Barahona *et al.*, 1994 y Sánchez-Fortún *et al.*, 1995 que sugieren el estadio naupliar de la *Artemia franciscana* de 72h con mayor sensibilidad a distintos xenobióticos. Asimismo con los resultados obtenidos a cada tiempo de exposición se demuestra que existen diferencias significativas con respecto a la sensibilidad de 72h que a las 24 y 48h de exposición de toxicidad aguda. Aunque existen datos en la literatura como los de Shazili & Pascoe (1986) donde se manifiesta que también la sensibilidad a los distintos contaminantes puede variar dependiendo de los distintos estadios de desarrollo. Los estudios de toxicidad normalizados son comúnmente realizados con organismos juveniles, ya que se les registra más sensibilidad, asegurando así la obtención de resultados que establezcan niveles de seguridad mayores frente a las exposiciones (Bartolomé & Sánchez, 2007).

Acorde a la clasificación propuesta por la EPA (Environmental Protection Agency) para categorizar a las sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos para toxicidad aguda (LC_{50} en mg/l), se encuentra que en la categoría o clase I se

clasifican las sustancias con una $LC_{50} \leq 1$ mg/l, es decir, en sustancias altamente tóxicas para organismos acuáticos, en la categoría II se encuentran las sustancias con una $LC_{50} >1 - \leq 10$ mg/l en sustancias tóxicas para organismos acuáticos, y en la categoría III con una $LC_{50} >10 - \leq 100$ mg/l en sustancias peligrosas para el ambiente acuático. Por tanto los colorantes de nuestro estudio expuestos a nauplios de *A. franciscana* pueden clasificarse en la categoría I, es decir, en sustancias o contaminantes altamente tóxicos para organismos acuáticos a las 72h de exposición.

7.1 Clorhidrato de Acriflavina

La toxicidad aguda del colorante en organismos acuáticos fue investigada por primera vez por Spangenberg en 1975. Entre 1995 y 1996 Obiekezie, Okafor y Taege observaron las LC_{50} de la acriflavina utilizando varias especies de bagre africano encontraron valores de LC_{50} (48h) entre 10-11.37mg/l, Así mismo un estudio realizado sobre aguas dulces en *Daphnia magna* a 48h por Svodova *et al.*, (1986), dio como resultado una LC_{50} (48h) de 100µg/l (0.1mg/l), clasificándola dentro de las sustancias de alta toxicidad para organismos acuáticos pertenecientes al primer nivel trófico. Igualmente por Svodova *et al.*, 1986 realizaron otro estudio sobre *Cyclops strenuus* y encontraron una LC_{50} (48h) de 18,700µg/l (18.7mg/l). Rodríguez *et al.*, (2011), concluyeron en un estudio realizado sobre el efecto de la acriflavina en la desinfección y la eclosión de huevos de botete diana *Sphoeroides annulatus*, el colorante causó un porcentaje bajo de eclosión de los huevos, además de observarse gran cantidad de bacterias heterótrofas en las dosis aplicadas con dicho colorante, también percibieron cambios morfológicos de los huevos como cambio de color a oscuro y deformaciones, y un alto porcentaje de mortalidad embrionaria a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/l.

Meinelt *et al.*, 1992 investigaron los efectos de la dureza del agua sobre la toxicidad de la acriflavina en peces cebrá *Danio rerio* y encontraron que la dureza del agua incrementa la toxicidad del colorante.

La acriflavina tiene propiedades potencialmente mutagénicas, desde que se demostró que provoca mutaciones en *E. coli* y en levaduras (Nasim & Brychcy, 1979; Albert, 1979), además presenta propiedades cancerígenas y foto induce

clastogenicidad en queratinocitos de hámster, investigación realizada por Benchabane *et al.*, (2009). En cultivo de leucocitos humanos se demostró que induce translocación y rotura de la cromátida. (Nasim & Brychcy, 1979).

Sin embargo, existe escasa información acerca de toxicidad aguda en peces o animales superiores del Clorhidrato de Acriflavina así como estudios de bioacumulación de este colorante.

7.1.2 Azul de Metileno

La toxicidad aguda del Azul de Metileno fue investigada por primera vez por Fitzgerald *et al.*, (1952) y determinaron la mortalidad de *Anacystis aeruginosa* a una concentración de 0.5mg/l (500µg/l) de azul de metileno. En 1973 Hughes determinó sobre aguas salinas la toxicidad aguda en *Morone saxatilis*, siendo el pez más sensible el cual obtuvo una LC₅₀ a 72h de 1mg/l. Así mismo, Iannacone *et al.*, (2007) sobre aguas dulces, obtuvieron en *Daphnia magna* una LC₅₀ a 72h de 0.54mg/l clasificándola como sustancia de alto riesgo para organismos acuáticos; Rifici *et al.*, (1996) realizando estudios sobre aguas dulces con larvas de *Pimephales promelas* determinaron una LC₅₀ a 96h de 15mg/l evidenciando a este colorante como peligroso.

La toxicidad del Azul de Metileno en la biota acuática viene dada por inducción de fototoxicidad, a concentraciones inferiores a las que causa mortalidad, puede presentar efectos sobre el crecimiento y la reproducción (Hall & Oris, 1991; Steinert, Montee, & Sastre, 1998). Los efectos subletales del colorante fotoactivado son a menudo debido a un daño directo o indirecto al ADN (Gasparro, 1988; Gasper, & Schuster, 1997; Lee & Kim., 2002). En un estudio realizado en *Bufo arenarum* por Stockert & Herkovits (2003), observaron que este colorante induce fototoxicidad dinámica a 10mg/l de azul de metileno.

Se sabe, que además provoca graves problemas de contaminación acuática al reducir la penetración de la luz y la inhibición de la fotosíntesis (Waranusantigui *et al.*, 2003; O'Mahony, 2002). Este colorante tiene un alto potencial de bioacumulación en tejidos de organismos acuáticos pues presenta un coeficiente de partición octanol/agua Log Po/w de 5.85, de acuerdo a la clasificación de bioacumulación propuesta por la GESAMP para sustancias químicas en organismos acuáticos, se

determina que para un Log Po/w de 1 a <2, se clasifican sustancias con potencial bajo de bioacumulación, 2 a <3 corresponde a un potencial bajo, de 2 a <4 el potencial es moderado, pero si se encuentra un Log Po/w de 4 a <5 la clasificación ya pasa a encuadrar estas sustancias dentro de un potencial alto de bioacumulación, mientras que si se encuentra con un Log Po/w >5 la clasificación de las sustancias ya es de muy alto potencial de bioacumulación. Reema *et al.*, (2011) comprobaron en un estudio realizado sobre *Lemna minor*, que el azul de metileno presenta la capacidad de acumularse en esta planta acuática y que conforme aumenta la concentración del colorante disminuye su crecimiento.

7.1.2 Oxalato de Verde de Malaquita

Acorde con los resultados obtenidos a las 72h de exposición, fue el colorante con mayor toxicidad, es decir, que a menor concentración presenta una mayor respuesta de letalidad en organismos zooplanctónicos.

Su toxicidad aguda fue estudiada por Iannacone *et al.*, (2007) obteniendo una LC₅₀ a 72h de 3.23mg/l sobre *Daphnia magna*, de acuerdo a este dato encontramos que *Artemia franciscana* mostró mayor toxicidad (0.000223 mg/l), si bien este aumento de sensibilidad puede deberse a que *Daphnia magna* y *Artemia franciscana* son especies diferentes y de distinto hábitat (agua dulce y salada, respectivamente). Sin embargo lo que sí queda claramente demostrado es que este colorante se muestra como altamente tóxico para los diferentes ecosistemas acuáticos.

Los peces como la trucha cuando son tratados con un baño de verde de malaquita por 1h a la concentración de 2 mg/l muestran menor peso, mayor mortalidad y anemia conforme aumenta su desarrollo, en sus etapas iniciales mostraron una mayor incidencia de tumores en el abdomen, en intestinos y el hígado (Sudova *et al.*, 2007). Se deduce de estos experimentos que las concentraciones letales para los peces y las concentraciones terapéuticas recomendadas frecuentemente se encuentran muy cercanas una de la otra.

El-Newehy *et al.*, (2011), encontraron una LC₅₀ a 96h de exposición sobre tilapia del Nilo de 0.76mg/l, y observaron cambios en las agallas e hiperplasia epitelial proliferativa, incrementándose la difusión del colorante, así como necrosis laminar, degeneración de células hepáticas por exposición crónica al colorante y necrosis

renal tubular, mientras que Hanan en el 2001 obtuvo sobre alevines de tilapia del Nilo una LC_{50} a 96h de 0.075mg/l.

Entre 1994 y 1995 Srivastava *et al.*, estudiaron la toxicidad sobre bagre y obtuvieron una LC_{50} de 1.0mg/l clasificándola de alta a muy alta toxicidad sobre organismos acuáticos.

Meinelt *et al.*, (2003), determinaron que un aumento en la concentración de Ca^{+2} en el agua de cultivo de larvas de pez cebra *Danio rerio*, aumenta la toxicidad del Verde de Malaquita obteniendo sobre este una LC_{50} a 96h de exposición de 0.061mg/l con altos niveles de Ca^{+2} , mientras que en bajos niveles de Ca^{+2} obtuvieron una LC_{50} de 0.134mg/l. Probablemente debido a la estimulación de la unión de calcio a la calmodulina activando a la calmodulina cinasa II en altas concentraciones de Ca^{+2} , se sabe que esta proteína es encargada en mediación de procesos inflamatorios, apoptosis, etc.

Además en varios estudios han demostrado que este colorante es altamente tóxico para los organismos de agua dulce y se aumenta su toxicidad cuando se incrementa la temperatura, tanto en exposiciones agudas como crónicas, y puede ocasionar carcinogénesis, mutagénesis, fracturas cromosómicas, teratogénesis y reducción de la fertilidad en organismos acuáticos tratados con este agente terapéutico. (Srivastava *et al.*, 2004).

La acuicultura ha estado utilizando verde de malaquita de forma continua como un tratamiento tópico de baño sin prestar ninguna atención al hecho de que este agente terapéutico aplicado tópicamente también puede ser absorbido sistémicamente y producir importantes efectos internos. Este colorante fue nominado por su toxicidad y propiedades carcinogénicas por la FDA y por el Instituto Nacional de Ciencias de Salud Ambiental y para estudios carcinogénicos por el Programa Nacional de Toxicología (NTP), además la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE.UU., no lo establece dentro de los aprobados, así mismo está prohibido tanto en Asia como Japón y Tailandia, así como en algunos países de la Unión Europea y Chile para su uso en cualquiera de las especies acuáticas, sin embargo, este colorante se sigue utilizando por ser relativamente económico de fácil acceso y altamente eficaz en países como el Reino Unido, Canadá, México entre otros. Tanto

el colorante como su forma reducida, Verde de Leucomalaquita son persistentes en el ecosistema y en los organismos acuáticos, por ejemplo, 1 mg/l de baño de verde de malaquita durante 1 hora puede producir un nivel en suero sanguíneo en los peces de hasta 14 mg/kg de agua a temperaturas templadas. Su eliminación a partir de tejidos de peces es extremadamente lento en exceso de 2000 días grado, es decir, 200 días a 10 °C (GESAMP, 1997).

En la Unión Europea de acuerdo a la Directiva 96/23/CE establece los Límites Mínimos de Funcionamiento Exigidos (MPRL) a sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido y, en particular, a sustancias cuya utilización no ha sido autorizada ni prohibida específicamente, establece un MPRL de 2µg/kg tanto para Verde de Malaquita como Verde de Leucomalaquita. En Alemania, por ejemplo, se estableció una tolerancia de menos de 0.01mg/kg en peces comestibles tanto de Verde de Malaquita como su forma reducida Verde de Leucomalaquita (Srivastava et al., 2004).

Finalmente, estos colorantes no están autorizados para su uso en veterinaria en organismos acuáticos de consumo humano de acuerdo a la FDA en E.U.A y están incluidos en Fármacos con *Alta Prioridad de Regulación* (Cloranfenicol, Quinolonas, Fluoroquinolonas, Benzocaína, Quinaldina, Nitrofuranos, Azul de metileno, Verde de Malaquita y Acriflavina). Este grupo genera preocupación por su residualidad en el ecosistema acuático y sus posibles efectos en el consumidor que accediera a productos derivados de peces de consumo que no hubieran sufrido un tiempo de retiro adecuado del fármaco en mención. (González, 2010) y han sido catalogados como carcinogénicos o mutagénicos, de ahí su prohibición en algunos países como, E.U.A, La Unión Europea y Asia.

8. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Podemos afirmar que con el presente estudio se demostró como la utilización del microcrustáceo *Artemia franciscana*, se trata de un organismo altamente adecuado para ser utilizado como bioindicador en bioensayos de ecotoxicidad acuática, sobre todo de ambientes acuáticos salinos, garantizando la fiabilidad, viabilidad y la relación de coste-eficacia en la investigación ecotoxicológica de xenobióticos. La norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI ha establecido a la *Artemia franciscana* como bioindicador 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 salinos.

Así mismo, se muestra que el colorante que presentó mayor letalidad a las concentraciones utilizadas fue el Oxalato de Verde de Malaquita a las 72h de exposición, seguido en respuesta de mortalidad por el Clorhidrato de Acriflavina y por último al Azul de Metileno.

Los tres colorantes ensayados de acuerdo a su LC_{50} a las 72h, se clasifican en sustancias altamente tóxicas para organismos acuáticos zooplanctónicos, lo cual hace peligrar a organismos en los niveles superiores de la cadena trófica, ya que si éste primer nivel queda afectado inmediatamente los niveles superiores también se afectarán. Los nauplios de *Artemia franciscana* al mismo tiempo, presentan una mayor sensibilidad a cada xenobiótico ensayado a las 72h, debido a que conforme aumenta el desarrollo naupliar, aumenta el desarrollo de su sistema nervioso hasta llegar al estado adulto donde otros mecanismos les hacen más resistentes; aunque se muestra claramente que la magnitud de la variación en la toxicidad es debida también a variaciones en las condiciones ambientales y del compuesto químico en particular e incluso de la especie.

Conjuntamente, estos colorantes son persistentes tanto en el ambiente acuático como en los organismos que son expuestos a dichos colorantes, así mismo, estas sustancias presentan metabolitos los cuales tienen propiedades carcinogénicas y mutagénicas, están prohibidos para su uso en veterinaria y están clasificados como *fármacos de alta prioridad de regulación* por la EPA, FDA y la OMS en países como E.U.A, Unión Europea, Chile y en algunos países de Asia como Tailandia y Japón,

sin embargo, en México, por ejemplo el Verde de Malaquita se sigue utilizando como terapéutico con alta actividad antiparasitida de amplio espectro por su bajo coste y fácil acceso.

En muchos casos, los productos químicos acuícolas no se han desarrollado específicamente para su uso acuícola. Así, los datos necesarios para evaluar los riesgos en el medio ambiente acuático, y en particular las aguas marinas, no están disponibles.

9. RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Esta investigación podría completarse con un estudio de toxicidad aguda en ambiente iluminado, ya que estos colorantes se fotoactivan generando especies reactivas del oxígeno (ROS), y por tanto la realización de un estudio comparativo entre bioensayos con ambiente de oscuridad (en acuicultura estos colorantes se administran en oscuridad por la causa anteriormente referida) versus ambiente iluminado, proporcionaría resultados que ampliarían la información sobre los riesgos toxicológicos por fotoactivación. Además realizar ensayos de toxicidad crónica y de bioacumulación sería altamente recomendable ya que existe escasa información acerca de este tipo de toxicidad sobre organismos de ecosistemas acuáticos, de esta forma se podrían establecer dosis/concentraciones que fueran adecuadas para la terapéutica y consumo de productos posteriormente, o bien en caso de alto riesgo e impacto, buscar alternativas al uso de este tipo de colorantes.

- **Control del estrés y mantenimiento de la salud de los peces:** La incidencia y gravedad de las enfermedades infecciosas dependen muchas veces de la calidad del entorno en que viven los organismos. Por ello, el primero y el más importante de los pasos para combatir las enfermedades infecciosas es mantener en la unidad de cultivo un entorno de la mayor calidad posible para reducir el estrés en los organismos sometidos a cultivo. El estrés en los peces puede definirse como la alteración de una o más variables fisiológicas hasta el punto de que corra peligro su supervivencia en el largo plazo. Dichas alteraciones son muchas veces resultados de cambios ocurridos en la calidad fisico-química, biológica y microbiana del ambiente acuático, y de la disponibilidad de alimento y espacio. El estrés se puede reducir manteniendo densidades de repoblación realistas y ofreciendo las mejores condiciones posibles de cultivo. La reducción del estrés combatirá el posible riesgo de infección y, de esa manera, disminuirá la mortalidad y otras pérdidas afines. En este contexto del manejo de la salud de los peces, deberá promoverse la colaboración entre los agricultores, extensionistas y especializados en este tema, con el fin de lograr una mayor sensibilidad y capacidad en la conservación de la salud de los peces y una mayor eficiencia en la ordenación de las explotaciones

- **Utilización de medicamentos, antibióticos y otros productos químicos para combatir las enfermedades:** Los acuicultores deberían contar con una variedad suficiente de materiales ensayados y aprobados para el tratamiento de las enfermedades acuáticas, y deberían formularse orientaciones y organizarse actividades de capacitación sobre su utilización responsable. En lo posible, estos materiales deberían utilizarse bajo supervisión veterinaria (o de un profesional calificado equivalente), y debería estar estrictamente regulada, si no prohibida, la comercialización y uso de medicamentos que no hayan sido certificados para ser utilizados en la producción acuícola. Para conseguir una eficacia máxima y continuada de los antibióticos, tanto para su uso en la acuicultura como, especialmente, para el tratamiento de las enfermedades de seres humanos, debería evitarse en la medida de lo posible el uso preventivo (profiláctico) de esas sustancias.

En la mayoría de los casos, los acuicultores no tienen acceso a suficiente información, tal como el método adecuado para su uso, dosis, eficacia, los organismos objetivo, el potencial de efectos adversos, y tiempo de espera, en relación con los productos químicos de control de enfermedades.

Por ejemplo, en determinadas ocasiones, las hormonas se utilizan en algunas formas de prácticas acuícolas para inducir o impedir la maduración reproductiva, para la inversión de sexos y para promover el crecimiento. Si bien es posible que las hormonas se utilicen ampliamente en la ganadería, su utilización en la acuicultura no está bien documentada y en ocasiones se lleva a cabo sin la debida comprensión de las cantidades necesarias ni de su persistencia en el medio ambiente o en los productos acuícolas una vez suprimido el tratamiento. Aunque no es probable que la utilización de hormonas para regular la reproducción tenga consecuencias contaminantes en las poblaciones destinadas al mercado, cuando se utilizan como promotoras del crecimiento, dicho uso debe estar perfectamente documentado y deben cumplirse escrupulosamente los períodos de suspensión de su administración antes de la cosecha.

Cuando están disponibles múltiples alternativas de terapéuticos químicos, los acuicultores deben seleccionar medicamentos no sólo sobre la base de los datos de eficacia, sino también en la información disponible en relación a la persistencia en el

ambiente, los posibles efectos sobre organismos no objetivo, la posible resistencia microbiana y la tasa de eliminación de residuos.

Además se deben mantener registros del uso de químicos, incluyendo los agentes utilizados, las cantidades, las razones para utilizar, los métodos de aplicación, fechas de uso, la cantidad, número y tamaño de poblaciones tratadas, éxito y/o fracaso de los tratamientos.

No deben descargarse en cuerpos de agua naturales efluentes que contengan cualquier residuo químico en concentraciones que puedan causar efectos biológicos adversos.

Implementar alternativas al uso de colorantes y de otros compuestos como el cloranfenicol, y el desarrollo de probióticos, biorremediación, inmunoestimulantes y vacunas.

La industria farmacéutica humana y la de animales terrestres es mucho más lucrativa y con mejores expectativas financieras que lo que pueda derivarse de esa misma inversión en drogas para uso acuícola. Por ello, muchos de esos esfuerzos de inversión, no ven en la generación de nuevos fármacos para la acuicultura, un negocio de rápido retorno del capital invertido y mantenimiento de un volumen de ventas elevado.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU-GROBOIS, F.A.; BEARDMORE, J.A. (1980). INTERNATIONAL STUDY ON ARTEMIA. II. GENETIC CHARACTERIZATION OF ARTEMIA POPULATIONS - AN ELECTROPHORETIC APPROACH: 133–146. IN: THE BRINE SHRIMP ARTEMIA. VOL. 1. MORPHOLOGY, GENETICS, RADIOBIOLOGY, TOXICOLOGY. PERSOONE, G.; SORGELOOS, P.; ROELS, O.; JASPERS, E. (EDS). UNIVERSA PRESS, WETTEREN, BELGIUM, 345 PP.**
- ACOSTA S. T., NÚÑEZ P. D. Y SUÁREZ L. M. (2003). ANEMIA HEMOLÍTICA POR DEFICIENCIA DE G6PD Y ESTRÉS OXIDATIVO. CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. REV CUBANA INVEST BIOMED 2003:22(3):186-91.**
- AGH, N., G.VAN STAPPEN, G. BOSSIER, P. SEPEHRI, H. LOFTI, V. ROUHANI, S.M.R.P. SORGELOOS. (2008). EFFECTS OF SALINITY ON SURVIVAL, GROWTH, REPRODUCTIVE AND LIFE SPAN CHARACTERISTICS OF ARTEMIA POPULATIONS FROM URMIA LAKE AND NEIGHBORING LAGOONS. PAK. J. BIOL. SCI. 11: 164-172.**
- AKIYAMA, M. D, G. D.WARREN & L. L. ADDISON. (1993). NUTRICIÓN DE CAMARONES PENEIDOS. IN: CRUZ, L. E., D, RICQUE & R. MENDOZA (EDS). MEMORIAS DEL PRIMER SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ACUICULTURA. ASA. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS UNANL. MONTERREY, N.L., PP. 43-47.**
- ALBA-TERCEDOR J. (1996). MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS Y CALIDAD DE LAS AGUAS DE LOS RÍOS. IV SIAGA. 2: 203-213.**
- ALBERT, A., (1979). SELECTIVE TOXICOLOGY, SIXTH ED. CHAPMAN & HALL, LONDON.**
- ALDERMAN, D.J., (1985). MALACHITE GREEN: REVIEW. J. FISH DIS. 8, 289–298.**
- ALDERMAN, D.J., CLIFTON-HADLEY, R.S., (1993). MALACHITE GREEN: A PHARMACOKINETIC STUDY IN RAINBOW TROUT, ONCORHYNCHUS MYKISS (WALBAUM). J. FISH DIS. 16 (4), 297–311.**
- ALLEN, S. J., KOUMANOVA, B. (2003). DECOLOURISATION OF WATER/WASTEWATER USING ADSORPTION. JOURNAL OF THE UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND METALLURGY, 40, 175-192.**

- ÁLVAREZ-LAJONCHÈRE L & MY TSUZUKI. (2008). A REVIEW OF METHODS FOR CENTROPOMUS SPP. (SNOOKS) AQUACULTURE AND RECOMMENDATIONS FOR THE ESTABLISHMENT OF THEIR CULTURE IN LATIN AMERICA. AQUACULTURE RESEARCH 39(7): 684-700.
- AMAT, F. (1985). BIOLOGÍA DE ARTEMIA. INFORME TÉCNICO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS. ESPAÑA. 127: 3-59.
- ANGLÉS H. M. (2006). SUSTANCIAS PELIGROSAS, RIESGO Y SALUD EN MÉXICO. MARCO NORMATIVO. PP: 48
- ARENZON A., FONTANA PINTO R., COLOMBO P. Y RAYA-RODRÍGUEZ M. T. (2003). ASSESSMENT OF THE FRESHWATER ANNUAL FISH CYNPOECILUS MELANOTAENIA AS A TOXICITY TEST ORGANISM USING THREE REFERENCE SUBSTANCES. ENVIRON. TOXICOL. CHEM. 22, 2188-2190.
- ARTOXKIT M. (1990). ARTEMIA TOXICITY SCREENING TEST FOR ESTUARINE AND MARINE WATERS. STANDARD OPERATIONAL PROCEDURE. CREASEL, DEINZE, BÉLGICA. 22 PP.
- AURÓ. (1996). TERAPÉUTICA DE LAS ENFERMEDADES DE LOS PECES. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. SECRETARIA DEL MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA. EDIT. DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA F.M.Z.UNAM: 113-116.
- AZMI, W., SAINI, R.K., BANERJEE, U.C. (1998) BIODEGRADATION OF TRIPHENYLMETHANE DYES. ENZYME MICROB. TECHNOL. 22: 185-191.
- BAIRD C. QUÍMICA AMBIENTAL: PRINCIPIOS DE TOXICOLOGÍA. EVALUACIÓN Y GESTIÓN DE RIESGOS. BARCELONA, ESPAÑA: (2001). EDITADO POR EDITORIAL REVERTÉ. P. 322-326. ISBN: 978-84-291-7902-6
- BARAHONA-GOMARIZ, M.V., SANZ-BARRERA, F., SÁNCHEZ-FORTÚN, S., (1994). ACUTE TOXICITY OF ORGANIC SOLVENTS ON ARTEMIA SALINA. BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 52, 766-771.
- BARATA C, HONTORIA F, AMAT F, BROWNE RA, (1996). DEMOGRAPHIC PARAMETERS OF SEXUAL AND PARTHENOGENETIC ARTEMIA: TEMPERATURE AND STRAIN EFFECTS. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY, 196: 329-340.

- BARRET. D.M., FAIGEL D.O., METZ D.C., MONTONE K., FURTH E.E., CLIN J. LAB. ANAL. 11 (1997) 374.**
- BARTOLOMÉ Y RODRÍGUEZ, (2007). VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE BIOCIDAS UTILIZADOS EN AMBIENTES DE LA VIDA PRIVADA Y LA SALUD PÚBLICA SOBRE ARTEMIA FRANCISCANA. REV. LAT. DE RECUR. NAT., 3 1: 90-97.**
- BARTOLOMÉ CAMACHO MA. CARMEN. VALORACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO SOBRE LARVAS DE ARTEMIA DE DESINFECTANTES UTILIZADOS EN TORRES DE REFRIGERACIÓN. MADRID, ESPAÑA, 2005. PRESENTADA EN LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA.**
- BAUTISTA SUÁREZ, LUCIANO. DEGRADACIÓN DE COLORANTES (AZUL DE METILENO) POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS. ORIZABA, VERACRUZ., (2011). PRESENTADA EN LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS PARA OBTENCIÓN DEL GRADO DE INGENIERO QUÍMICO. 76P.**
- BEG, M.U., ET AL., (2001). CHEMICAL CONTAMINATION AND TOXICITY OF SEDIMENT FROM A COASTAL AREA RECEIVING INDUSTRIAL EFFLUENTS IN KUWAIT. ARCH. ENV. CONTAM. TOXICOL. 41: 289 – 297.**
- BENCHABANE Y., GIORGIO C., BOYER G., SABATIER A.S, ALLEGRO D., PEYROT V., DE MÉO M. (2009). PHOTO-INDUCIBLE CYTOTOXIC AND CLASTOGENIC ACTIVITIES OF 3,6-DI-SUBSTITUTED ACRIDINES OBTAINED BY ACYLATION OF PROFLAVINE. 2009 ELSEVIER MASSON SAS. EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 44. 2459–2467.**
- BEN-HUR E., N.E. GEACINTOV, B. STUDAMIRE, M.E. KENNEY Y B. HOROWITZ. (1995). THE EFFECT OF IRRADIANCE ON VIRUS STERILIZATION AND PHOTODYNAMIC DAMAGE IN RED BLOOD CELLS SENSITIZED BY PHTHALOCYANINES, PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG., 61, 190-195.**
- BLACK, J.J., HOLMES, M., DYMERSEKI, P.P., ZAPISEK, W.F. (1980) FISH TUMOR PATHOLOGY AND AROMATIC HYDROCARBON POLLUTION IN A GREAT LAKES ESTUARY. EN: AFGHAN, B.K., MACKOY, D. (EDS.) HYDROCARBONS AND HALOGENATED HYDROCARBONS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT. PLENUM PRESS, NEW YORK. P. 559-565.**

- BOWEN S.T., DURKIN, J.P., STERLING, G. Y CLARK, S.L. (1978). ARTEMIA HEMOGLOBINS: GENETIC VARIATION IN PARTHENOGENETIC AND ZYGOGENETIC POPULATIONS. BIOL. BULL. 155: 273-287.
- BOWEN, S.T., E.A. FOGARINO, K.N. HITCHNER, G.L. DANA, V.H.S. CHOW, M.R. BUONCRISTIANI & J.R. CARL. (1985). ECOLOGICAL ISOLATION IN ARTEMIA: POPULATION DIFFERENCES IN TOLERANCE OF ANION CONCENTRATIONS. J. CRUST. BIOL. 5: 106-129.
- BOYD, C.E. AND MASSAUT, L., (1999). RISKS ASSOCIATED WITH THE USE OF CHEMICALS IN POND AQUACULTURE. AQUAC.ENG., 20, P. 113-132.
- BRAS, M., QUEENAN, B., SUSIN, S.A., (2005). PROGRAMMED CELL DEATH VIA MITOCHONDRIA: DIFFERENT MODES OF DYING. BIOCHEMISTRY (MOSC.) 70 (2), 231-239.
- BROWNE, R.A. & S.T. BOWEN. (1991). TAXONOMY AND POPULATION GENETICS OF ARTEMIA, P. 221-235. IN R.A. BROWNE, P. SORGELOOS & C.N.A. TROTMAN CNA (EDS.). ARTEMIA BIOLOGY. CRC BOCA RATON, FLORIDA, USA.
- BURRIDGE L, J WEIS, F CABELLO & J PIZARRO (2008) CHEMICAL USE IN SALMÓN AQUACULTURE: A REVIEW OF CURRENT PRACTICES AND POSSIBLE ENVIRONMENTAL EFFECTS. REPORT OF THE TECHNICAL WORKING GROUP ON CHEMICAL USE IN SALMÓN AQUACULTURE OF THE WORLD WILDLIFE FUND SALMÓN AQUACULTURE DIALOGUE. WORLD WILDLIFE FUND, WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS. URL: [HTTP://WWW.WORLDWILDLIFE.ORG/WHAT/GLOBALMARKETS/AQUACULTURE/WWFBINARyITEM8842.PDF](http://www.worldwildlife.org/what/globalmarkets/aquaculture/WWFBINARyITEM8842.PDF) (ACCEDIDO JUNIO 26, 2009).
- BURRIEL F., LUCENA F., ARRIBAS S., HERNÁNDEZ J. (1999). QUÍMICA ANALÍTICA CUALITATIVA, 17ª ED., PARANINFO, MADRID.
- BUSCHMANN, A. H., RIQUELME, V. A., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C., VARELA, D., JIMÉNEZ, J. E., HENRÍQUEZ, L.A., VERGARA, P.A., GUÍÑEZ, R. Y FILÚN, L. (2006). A REVIEW OF THE IMPACTS OF SALMON FARMING ON MARINE COASTAL ECOSYSTEMS IN THE SOUTHEAST PACIFIC. - ICES JOURNAL OF MARINE SCIENCE., 63: EN PRENSA.
- BUSCHMANN, ALEJANDRO. (2001). IMPACTO AMBIENTAL DE LA ACUICULTURA. EL ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN EN CHILE Y EL MUNDO, TERRAM PUBLICACIONES, SANTIAGO DE CHILE. 67 PP.

- CAIRNS, J. Y DICKSON, K. L. (1971). A SIMPLE METHOD FOR THE BIOLOGICAL ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF THE WATER DISCHARGES ON AQUATIC BOTTOMDWELLING ORGANISMS. J. WAT. POLL. CONTROL FED. 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.
- CANDÉ, C., CECCONI, F., DESSEN, P., KROEMER, G., (2002). APOPTOSIS-INDUCING FACTOR (AIF): KEY TO THE CONSERVED CASPASE-INDEPENDENT PATHWAYS OF CELL DEATH? J. CELL SCI. 115 (PT 24), 4727–4734.
- CARSON, J., L. M. SCHMIDTKE, AND B. L. MUNDAY. (1993). CYTOPHAGA JOHNSONAE: A PUTATIVE SKIN PATHOGEN OF JUVENILE FARMED BARRAMUNDI, LATES CALCARIFER BLOCH. JOURNAL OF FISH DISEASES 16:209–218.
- CASTAGNETTA, L.A. AND G. CARRUBA, (1995). HUMAN PROSTATE CANCER: A DIRECT ROLE FOR OESTROGENS. CIBA FOUND.SYMP., 191:269-86
- CASTRO, B.T., A.S. MALPICA, J.M. CASTRO, G.M. CASTRO & R.A. DE LARA. (2000). ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ARTEMIA ECOSYSTEMS IN MÉXICO: AND UPDATED REVIEW, P. 191-202. IN M. MUNAWAR, S.G. LAWRENCE, I.F. MUNAWAR & D.F. MALLEY (EDS.). AQUATIC ECOSYSTEMS OF MÉXICO. STATUS AND SCOPE. BACKHUYS, LEIDEN, THE NETHERLANDS.
- CEBRIÁN, J. E I. VALIELA. (1999). SEASONAL PATTERNS IN PHYTOPLANKTON BIOMASS IN COASTAL ECOSYSTEMS. J. PLANKTON RES., 21(3):429-444.
- CHAPMAN P.M. (2000). WHOLE EFFLUENT TOXICITY TESTING–USEFULNESS, LEVEL OF PREDICTION, AND RISK ASSESSMENT. ENVIRON. TOXICOL. CHEM. 19, 3–13.
- CHAPMAN P.M. (2006). EMERGING SUBSTANCES- EMERGING PROBLEMS? ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY. 25: 1445-1447.
- CHEN, J. C. & P. C. LIU. (1987). ACCUMULATION OF HEAVY METALS IN THE NAUPLII OF ARTEMIA SALINA. JOURNAL WORLD AQUACULTURE SOCIETY 18 (2): 84-93.

- CIFUENTES J.L., TORRES G.P., FRÍAS M. M. (1997). EL OCÉANO Y SUS RECURSOS: PROCEDIMIENTOS GENERALES DE LA ACUICULTURA. SEGUNDA EDICIÓN. MÉXICO, D.F, FONDO DE CULTURA ECONÓMICA: ISBN 968-16- 5242-8. DISPONIBLE EN [HTTP://BIBLIOTECADIGITAL.ILCE.EDU.MX/SITES/CIENCIA/VOLUMEN2/CIENCIA3/090/HTML/SEC_2.HTML](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/090/html/sec_2.html)
- CIVERA, R. (1993). REQUERIMIENTOS MINERALES DE CRUSTÁCEOS. IN: CRUZ, L. E., D. RICQUE & R. MENDOZA (EDS). MEMORIAS DEL PRIMER SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ACUICULTURA. ASA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNANL. MONTERREY, N.L., PP. 107-121
- CLIFTON J. 2ND & LEIKIN J.B. (2003). METHYLENE BLUE. AMERICAN JOURNAL OF THERAPEUTICS. 10: 289-291.
- COSTAMAGNA S.R., DUPIN J., VAYLET S. & PELLEGRINO P. (2004). EVALUACIÓN DEL FIJADOR-COLORANTE AZUL DE METILENO PARA EL DIAGNÓSTICO DIRECTO DE TRICOMONAS VAGINALIS. ACTA BIOQUÍMICA CLÍNICA LATINOAMERICANA. 38: 307-309.
- COSTA-PIERCE BA, A BUSCHMANN, S CROSS, JL IRIARTE, Y OLSEN & G REÍD (2008) NUTRIENT IMPACTS OF FARMED ATLANTIC SALMÓN (SALMO SALAR) ON PELAGIC ECOSYSTEMS AND IMPLICATIONS FOR CARRYING CAPACITY. REPORT OF THE TECHNICAL WORKING GROUP ON NUTRIENTS AND CARRYING CAPACITY OF THE WORLD WILDLIFE FUND SALMÓN AQUACULTURE DIALOGUE. WORLD WILDLIFE FUND, WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS. URL: [HTTP://WWW.WORLDWILDLIFE.ORG/CCI/PUBS/NUTRIENT IMPACTS SALMONCULTURE COMMISSIONED BY SALMON DIAL.PDF](http://www.worldwildlife.org/cc/pubs/nutrient_impacts_salmonculture_commissioned_by_salmon_dialogue.pdf)
- CULP, S.J., BLANKENSHIP, L.R., KUSEWITT, D.F., DOERGE, D.R., MULLIGAN, L.T., AND BELAND, F.A. (1999). TOXICITY AND METABOLISM OF MALACHITE GREEN AND LEUCOMALACHITE GREEN DURING SHORT-TERM FEEDING TO FISCHER 344 RATS AND B6C3F1 MICE. CHEM. BIOL. INTERACT. 126, 153-170.
- CULP, S.J., MELICK, P.W., TROTTER ,R.W., GREENLEES, K.J., KODELL, R.L., BELAND, F.A. (2006). CARCINOGENICITY OF MALACHITE GREEN CHLORIDE AND LEUCOMALACHITE GREEN IN B6C3F1 MICE AND F344 RATS. FOODCHEM.TOXICOL. 44,1204-1212.

- D.G. DOUET, H. LE BRIS, E. GIRAUD. (2009). ENVIRONMENTAL ASPECTS OF DRUG AND CHEMICAL USE IN AQUACULTURE: AN OVERVIEW. THE USE OF VETERINARY DRUGS AND VACCINES IN MEDITERRANEAN AQUACULTURE. OPTIONS MÉDITERRANÉENNES, A / NO. 86. 21, P. 105-126.
- D.R. DOERGE, M.I. CHURCHWELL, T.A. GEHRING, Y.M. PU, S.M. PLAKAS. (1998). RAPID COMMUN. MASS SPECTROM. 12 1625.
- DAHL. T.A. (1994). EXAMINING THE ROLE OF SINGLET OXYGEN IN PHOTSENSITIZED CYTOTOXICITY, EN AQUATIC AND SURFACE PHOTOCHEMISTRY, EDITADO POR G.R. MELZ, R.G. ZEPP Y D.G. CROSBY, CRC PRESS, BOCA RATON, FLORIDA, 241-258.
- DE LA PEÑA DE TORRE E., GÓMEZ C. MA. E. (2004). INTRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS. JORNADAS AETOX-SESA, TOXICOLOGÍA AMBIENTAL. CELEBRADAS CEMACAM, TORRE GUIL. SANGONERA LA VERDE (MURCIA) DE 22 AL 25 DE MARZO DEL 2004. PP: 12.
- DE LA TORRE A., ÑUÑOZ MA. J., CARBALLO M. (2004). CURSO SOBRE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL Y SEGURIDAD QUÍMICA: EVALUACIÓN MEDIOAMBIENTAL. EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA. REPERCUSIÓN AMBIENTAL. SANIDAD AMBIENTAL. CISA. PP: 15
- DE ZWART, D., (1995). MONITORING WATER QUALITY IN THE FUTURE, VOL. 3: BIOMONITORING THE NETHERLANDS, BILTHOVEN, 83 PP.
- DESELENS R, BABLET J. (1944). RECHERCHES SUR LA TOZIDT~ DES D6RIV6S TRIPHENYLMETHANIKUES ANTHELMINTHIQUES. COMPT RENDTM SOC BIOL 138:838-839.
- DORN P.B., RODGERS JR. J.H., KOP K.M., RAIA J.C. Y DICKSON K.L. (1987). HEXAVALENT CHROMIUM AS A REFERENCE TOXICANT IN EFFLUENT TOXICITY TESTS. ENVIRON. TOXICOL. CHEM. 6, 435-444.
- EEA. EUROPE'S ENVIRONMENT 2003: THE THIRD ASSESSMENT. ENVIRONMENTAL ASSESSMENT REPORT. No. 10.
- ELLIOTT DG & DF AMEND. (1978). EFFICACY OF CERTAIN DISINFECTANTS AGAINST INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS. JOURNAL OF FISH BIOLOGY 12: 277-286.

- EPA-SOUTH AUSTRALIA. (2003). SOUTH AUSTRALIA STATE OF THE ENVIRONMENT REPORT. AUSTRALIA.
- FAJARDO, L. J. (2002). EFFECT OF ZEOLITIC MATERIAL ON AMMONIA CONCENTRATION DURING FISH TRANSPORT. UNDERGRADUATE THESIS. COLLEGE OF FISHERIES, CENTRAL LUZON STATE UNIVERSITY, SCIENCE CITY OF MUÑOZ, NUEVA ECIJA. 55 PP.
- FAO (2007). «EL ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA 2006» (SOFÍA 2006). DEPÓSITO DE DOCUMENTOS DE LA FAO, ROMA.
- FAO (2009). STATE OFWORLD FISHERIES AND AQUACULTURE (SOFIA) 2008. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, ROME, ITALY. 176PP.
- FERGUSON, L. R. & DENNY, W. A. (1991). THE GENETIC TOXICITY OF ACRIDINES. MUTATION RESEARCH 258, 123–60.
- FERNANDES, C., LALITHA, V.S. AND RAO, K.V.K. (1991). ENHANCING EFFECT OF MALACHITE GREEN ON THE DEVELOPMENT OF HEPATIC PRE-NEOPLASTIC LESIONS INDUCED BY NNITROSODIETHYLAMINE IN RATS. CARCINOGENESIS 12, 839-845.
- FINNEY D.J., (1971). L. PROBIT ANALYSIS. (ANÁLISIS PROBIT) 3A. ED. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDRES. 333 PP
- FITZGERALD, G.P., G.C. GERLOFF, AND F. SKOOG. (1952). STUDIES ON CHEMICALS WITH SELECTIVE TOXICITY TO BLUE-GREEN ALGAE. SEWAGE IND. WASTES24 (7): 888-896
- GABRIELLI D, BELISLE E, SEVERINO D, KOWALTOWSKI AJ, BAPTISTA MS. (2004). BINDING, AGGREGATION AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF METHYLENE BLUE IN MITOCHONDRIAL SUSPENSIONS. PHOTOCHEM PHOTOBIO 79:227–232.
- GARAVITO, GIOVANNY; BERTANI, STEPHANE Y DEHARO, ERIC. (2008). HALLAZGOS COMPLEMENTARIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DEL AZUL DE METILENO Y SU TOXICIDAD. VITAE [EN LÍNEA] VOL. DISPONIBLE EN INTERNET: [HTTP://REDALYC.UAEMEX.MX/SRC/INICIO/ARTPDFRED.JSP?ICVE=1698153940](http://REDALYC.UAEMEX.MX/SRC/INICIO/ARTPDFRED.JSP?ICVE=1698153940) 10. ISSN 0121-4004.

- GARCÍA F. D. (2002). FOTSENSIBILIZACIÓN Y EL SENSIBILIZADOR: SÍNTESIS, PROPIEDADES Y LIMITACIONES. PROYECTOS SOLWATER Y AQUACAT (ICA4-CT-2002-10001 Y ICA3-CT-2002-10028. LABORATORIO DE FOTOQUÍMICA APLICADA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. SOLAR SAFE WATER. (14). PP: 16. 227-242.
- GARCÍA-ORTEGA, A. (2000). VALOR NUTRICIONAL DE LOS QUISTES DE ARTEMIA Y SU USO COMO FUENTE DE PROTEÍNA EN DIETAS ARTIFICIALES PARA LARVAS DE PECES. IN CRUZ-SUÁREZ, L. E., D. RICQUE-MARIE, M. TAPIA-SALAZAR, M. A. OLVERA- NOVOA Y R. CIVERA-CERECEDO (EDS.). AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA V. MEMORIAS DEL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.
- GARCÍA-ORTEGA, A., A. KOUSSOULAKI, H. BOER Y J. VERRETH. (2000). IN VITRO PROTEIN DIGESTIBILITY OF ARTEMIA DECAPSULATED CYST AND NAUPLII AND OF MICROBOUND DIETS FOR LARVAL FISH. AQUACULTURE RESEARCH 31: 475-477.
- GASPARRO, F. P. (1998). IN F. P. GASPARRO (ED.), PSORALEN DNA PHOTOBIOLOGY (VOL. I; 136 PP.). BOCA RATON: CRC PRESS.
- GASPER, S. M., & SCHUSTER, G. B. (1997). JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 119, 12762–12771.
- GESAMP (JOINT GROUP OF EXPERTS ON THE SCIENTIFIC ASPECTS OF MARINE ENVIRONMENTAL PROTECTION). (1997). TOWARDS SAFE AND EFFECTIVE USE OF CHEMICALS IN COASTAL AQUACULTURE. REP. STUD. (IMO/ FAO/ UNESCO/ IOC// WMO/ WHO/ IAEA/ UN/ UNEP, 65: 40 PP.
- GILCHRIST, B. M. (1954). HAEMOGLOBIN IN ARTEMIA. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B. 143: 136-146.
- GONZÁLEZ-MANTILLA JF. (2011). FARMACOLOGÍA, TERAPÉUTICA Y ANESTESIA DE PECES, ASOCIACIÓN DE VETERINARIOS DE VIDA SILVESTRE (VVS) ISSN 2011 – 9348. 12 P. 51-63.
- GOURANCHAT, C. (2000). MALACHITE GREEN IN FISH CULTURE (STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES). BIBLIOGRAPHIC STUDIES. ECOLE NATL. VETERINAIRE ENVT, NANTES, FRANCE, 142 PP.
- GREEN (CAS NOS. 569-64-2 AND 129-73-7) ADMINISTERED IN FEED TO F344/N RATS AND B6C3F1 MICE. TOXICITY

- GUPTA, S., SUNDARRAJAN, M., RAO, K.V.K., (2003). TUMOR PROMOTION BY METANIL YELLOW AND MALACHITE GREEN DURING RAT HEPATOCARCINOGENESIS IS ASSOCIATED WITH DYSREGULATED EXPRESSION OF CELL CYCLE REGULATORY PROTEINS. TERATOG. CARCINOGEN. MUTAGEN. 1, 301-312.
- HALL, A. T., & ORIS, J. T. (1991). AQUATIC TOXICOLOGY, 19, 249-264.
- HANAN, A. (2001) : DETERMINATION OF THE TOXIC AND THERAPEUTIC LEVELS OF SOME WATER-BORNE CHEMOTHERAPEUTICS ADMINISTERED TO CULTURED FRESH WATER FISHES IN EGYPT; ASSUIT UNIVERSITY CENTER FOR ENVIRONMENTAL STUDIES.; THESIS (M.SC).
- HARPER C. (2002). DISEASE RISKS ASSOCIATED WITH IMPORTATION OF ACUATIC ANIMALS. AQUACULTURE MAGAZINE. 28(20): 62-66
- HOBBS D.A., WARNE M.ST.J. Y MARKICH S.J. (2005). EVALUATION OF CRITERIA USED TO ASSESS THE QUALITY OF AQUATIC TOXICITY DATA. ENVIRON. TOXICOL. CHEM. 1, 174-180.
- HORSEFIELD P., LOGAN, F.A., NEWHEY, J. A. (1976) ORAL IRRITATION WITH GENTIAN VIOLET. BRITISH MEDICAL JOURNAL. 2: 529.
- HUGHES, J.S. (1973). ACUTE TOXICITY OF THIRTY CHEMICALS TO STRIPED BASS (MORONE SAXATILIS) LA. DEP. WILDL. FISH. 318-343- 2417:15 P. EN: ACQUIRE (AQUATIC TOXICITY INFORMATION RETRIEVAL) DATABASE. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, NATIONAL HEALTH AND ENVIRONMENTAL EFFECTS RESEARCH LABORATORY, MID-CONTINENT ECOLOGY DIVISION, DULUTH, MINNESOTA.
- IANNAcone J., CABALLERO C.R. & RENTERIA J.A. (1999). LA TÉCNICA DE PRECOLORACIÓN DE WALKER PARA EVALUAR PLASMODIUM VIVAX GRASSI Y PLASMODIUM MALARIAE LAVERAN EN COMUNIDADES ASHÁNINKAS EN SATIPO (JUNÍN, PERÚ). REVISTA PERUANA DE BIOLOGÍA. 6: 171-180.
- IGNARRO, L. J., BURKE, T. M., WOOD, K. S., WOLIN, M. S., AND KADOWITZ, P. J. (1984). ASSOCIATION BETWEEN CYCLIC GMP ACCUMULATION AND ACETYLCHOLINE-ELICITED RELAXATION OF BOVINE INTRAPULMONARY ARTERY. J PHARMACOL EXP THER 228, 682-690.
- INGERSOLL CG. (1995). SEDIMENT TOXICITY TEST. IN: RAND GM, EDITOR. FUNDAMENTALS OF AQUATIC TOXICOLOGY. 2ND ED. WASHINGTON DC: TAYLOR & FRANCIS. P 231-255.

- ISENMANN, P. (1975). OBSERVATIONS SUR LA MOUETTE PYGMÉE (LARUS MINUTUS) EN CAMARGUE DE 1971 À 1974. TERRE ET VIE, 29(1):77-88.
- JANG, G.H., PARK, I.-S., LEE, S.H., HUH, T.-L., LEE, Y.M. (2009). MALACHITE GREEN INDUCES CARDIOVASCULAR DEFECT SINDEVELOPING ZEBRAFISH (DANIO RERIO) EMBRYOS BY BLOCKING VEGFR-2 SIGNALING. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 382, 486–491.
- JIANG Y., XIE P., LIANG G. (2009). DISTRIBUTION AND DEPURATION OF THE POTENTIALLY CARCINOGENIC MALACHITE GREEN IN TISSUES OF THREE FRESHWATER FARMED CHINESE FISH WITH DIFFERENT FOOD HABITS. DOI:10.1016/J.AQUACULTURE.2008.10.025. AQUACULTURE 288. 1–6
- JOHANNES, R. E. Y S. B. BETZER. (1975). INTRODUCTION: MARINE COMMUNITIES RESPOND DIFFERENTLY TO POLLUTION IN THE TROPICS THAN AT HIGHER LATITUDES. EN: E. J. FERGUSON WOOD Y R. E. JOHANNES (EDS.). TROPICAL MARINE POLLUTION. ELSEVIER OCEANOGRAPHY SERIES 12, AMSTERDAM. PP. 1-12.
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING (70TH: 2008: GENEVA, SWITZERLAND). EVALUATION OF CERTAIN VETERINARY DRUG RESIDUES IN FOOD: SEVENTIETH REPORT OF THE JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES.
- JUNG Y.K., SONG M. & JAE-CHUN R. (2008). IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES (DEGS) BY MALACHITE GREEN IN HEPG2 CELLS. MOL. CELL. TOXICOL. VOL. 4(1), 22-30. DISPONIBLE EN: WWW.TOX.OR.KR
- KOWALTOWSKI, A.J., TURIN, J., INDIG, G.L., VERCESI, A.E. (1999). MITOCHONDRIAL EFFECTS OF TRIARYLMETHANE DYES. J. BIOENERG. BIOMEMBR. 31 (6), 581–590.
- KWOK K.W.H., LEUNG K.M.Y., LUI G.S.G., CHU V.K.H., LAM P.K.S., MORRIS D., MALTBY L., BROCK T.C.M., VAN DEN BRINK P.J., WARNE M.ST.J. Y CRANE M. (2007). COMPARISON OF TROPICAL AND TEMPERATE FRESHWATER ANIMAL SPECIES' ACUTE SENSITIVITIES TO CHEMICALS: IMPLICATIONS FOR DERIVING SAFE EXTRAPOLATION FACTORS. ENVIRON. TOXICOL. CHEM. 3, 49-67.
- LACHER T.E. & GOLDSTEIN M.I. (1997). TROPICAL ECOTOXICOLOGY: STATUS AND NEEDS. ENVIRON. TOXICOL. CHEM. 16, 100-111.

- LAVENS, P. & P. SORGELOOS. (2000). THE HISTORY, PRESENT STATUS AND PROSPECTS OF THE AVAILABILITY OF ARTEMIA CYST FOR AQUACULTURE. *AQUACULTURE* 181: 397-403.
- LEE R., KIM G.B. (2002). COMET ASSAYS TO ASSESS DNA DAMAGE AND REPAIR IN GRASS SHRIMP EMBRYOS EXPOSED TO PHOTOTOXICANTS. *MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH* 54 465-469.
- LEE R., KIM G.B. (2002). COMET ASSAYS TO ASSESS DNA DAMAGE AND REPAIR IN GRASS SHRIMP EMBRYOS EXPOSED TO PHOTOTOXICANTS. *MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH* 54 (2002) 465-469. DISPONIBLE EN: WWW.ELSEVIER.COM/LOCATE/MARENVREV
- LEÓN-MUÑOZ J, D TECKLIN, A FARÍAS & S DÍAZ- (2007) SALMONICULTURA EN LOS LAGOS DEL SUR DE CHILE ECORREGIÓN VALDIVIANA. REPORT OF THE TECHNICAL WORKING GROUP ON SALMÓN FARMING IN LAKES OF THE WORLD WILDLIFE FUND SALMÓN AQUACULTURE DIALOGUE. WORLD WILDLIFE FUND, WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS. URL: [HTTP://WWW.WWF.CL/ARCHIVOS_PUBLICACIONES/INFORME%20SALMONES%20LAGOS%20SUR%20DE%20CHILE-RESTRICCION.PDF](http://WWW.WWF.CL/ARCHIVOS_PUBLICACIONES/INFORME%20SALMONES%20LAGOS%20SUR%20DE%20CHILE-RESTRICCION.PDF)
- LILLIE R. D. (1977). CONN'S BIOLOGICAL STAINS. WILLIAMS & WILKINS, 9TH EDITION. BALTIMORE, MD., U.S.A. 692 PP.
- M. S. EL-NEWESHY & M. A. ABOU SRAG. (2011). CHRONIC MALACHITE GREEN TOXICITY IN NILE TILAPIA: PATHOLOGICAL AND HEMATOLOGICAL STUDIES WITH SPECIAL REFERENCE TO QUANTITATIVE HISTOPATHOLOGICAL ASSESSMENT. *RESEARCHER*. 3(4):55-64]. (ISSN: 1553-9865). [HTTP://WWW.SCIENCEPUB.NET](http://WWW.SCIENCEPUB.NET).
- MACI, RUDOLPH. QUÍMICA ORGÁNICA SIMPLIFICADA, EDITORIAL REVERTÉ. (1986). P.423-484
- MADSEN, H. C., K. BUCHMANN, & S. MELLERGAARD. (2000). TREATMENT OF TRICHODINIASIS IN EEL (*ANGUILLA ANGUILLA*) REARED IN RECIRCULATION SYSTEMS IN DENMARK: ALTERNATIVES TO FORMALDEHYDE. *AQUACULTURE* 186:221-231.

MALACHITE GREEN CHLORIDE AND LEUCOMALACHITE GREEN ADMINISTERED IN FEED TO F344/N RATS AND B6C3F1 MICE, IN: NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, TOXICITY REPORT SERIES NO. 71. DISPONIBLE EN: [HTTP://WWW.EHP.NIEHS.NIH.GOV/NTP/DOCS](http://www.ehp.niehs.nih.gov/ntp/docs)

MARTÍNEZ-JERÓNIMO F., RODRÍGUEZ-ESTRADA J., MARTÍNEZ-JERÓNIMO L. (2008). DAPHNIA EXILIS HERRICK, 1895 (CRUSTACEA: CLADOCERA). UNA ESPECIE ZOOPLANCTÓNICA POTENCIALMENTE UTILIZABLE COMO ORGANISMO DE PRUEBA EN BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA EN AMBIENTES TROPICALES Y SUBTROPICALES. REV. INT. CONTAM. AMBIENT. 24 (4) 153-159.

MATHÉ G. (2001). THE FAILURE OF HAART TO CURE THE HIV-1/AIDS COMPLEX. SUGGESTIONS TO ADD INTEGRASE INHIBITORS AS COMPLEMENTARY VIROSTATICS, AND TO REPLACE THEIR CONTINUOUS LONG COMBINATION APPLICATIONS BY SHORT SEQUENCES DIFFERING BY DRUG ROTATIONS. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, VOLUME 55, ISSUE 6, PAGES 295-300. PMID: 11478579

MEINELT T., PIETROCK M., WIENKE A., VÖLKER F. (2003). HUMIC SUBSTANCES AND THE WATER CALCIUM CONTENT CHANGE THE TOXICITY OF MALACHITE GREEN. J. APPL. ICHTHYOL. BLACKWELL VERLAG, BERLIN ISSN 0175-8659. 19 (2003), 380-382

MEINELT, T., A. STUBER, AND G. STAAKS. (1992). DIE PRAKTIKABILITÄT EINES EMBRYO-BRUT-TESTES MIT DEM ZEBRABACHEN (BRACHYDANIO RERIO HAMILTON-BUCHANAN), DARGESTELLT AM BEISPIEL FISCHEREILICH GENUTZTER THERAPEUTIKA. FORTSCHRITTE DER FISCHEREIWISSENSCHAFTEN, GERMANY 10:111-133.

MEINELT, T., R. PLAYLE, K. SCHRECKENBACH, & M. PIETROCK. (2001). INTERACTION OF THE ANTIPARASITIC MIXTURE FMC, HUMIC SUBSTANCES, AND THE WATER CALCIUM CONTENT. AQUACULTURE RESEARCH 32:405-411.

MOHAMED S, G. NAGARAJ, FHC CHUA & YG WANG. (2000). THE USE OF CHEMICALS IN AQUACULTURE IN MALAYSIA AND SINGAPORE. IN: ARTHUR JR, CR LAVILLA-PITOGO & RP SUBASINGHE (EDS). USE OF CHEMICALS IN AQUACULTURE IN ASIA. PROCEEDINGS OF THE MEETING ON THE USE OF CHEMICALS IN AQUACULTURE IN ASIA 20-22 MAY 1996, TIGBAUAN, ILOILO, PP. 127-140.

- MORAITI-LOANNIDOU, M., J. CASTRITSI-CATHARIOS, H. MILIOU & Y. P. KOTZAMANIS. (2007). **FATTY ACID COMPOSITION AND BIOMETRY OF FIVE GREEK ARTEMIA POPULATIONS SUITABLE FOR AQUACULTURE PURPOSES. AQUACULTURE RESEARCH 38: 1664-1672.**
- MORIARTY D.J.W, (2001). **HAZARDS OF ANTIBIOTIC USE IN AQUACULTURE. GLOBAL AQUACULTURE ADVOCATE. VOL 4(5):15-17**
- MOUNT, D.I. Y NORBERG T.J. (1984). **A SEVEN-DAY LIFE CYCLE CLADOCERAN TOXICITY TEST. ENVIRON. TOXICOL. CHEM. 3, 425-434.**
- NAGANO T., T. TANAKA, H. MIZUKI Y M. HIROBE. (1994). **TOXICITY OF SINGLET OXYGEN GENERATED THERMOLYTICALLY IN ESCHERICHIA COLI, CHEM. PHARM. BULL., 42, 883-887.**
- NASIM A. & BRYCHCY T. (1979). **GENETIC EFFECTS OF ACRIDINE COMPOUNDS. ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS. MUTATION RESEARCH, 65. 261-288. ISSUED AS NRCC NO. 17661.**
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP) (2004). **TOXICITY STUDIES OF MALACHITE GREEN CHLORIDE AND LEUCOMALACHITE**
- NAYLOR, R.L., R. J. GOLDBURG, J. PRIMAVERA, N. KAUTSKY, M. C. M. BEVERIDGE, J. CLAY, C. FOLKE, J. LUBCHENCO, H. MOONEY , & M. TROELL. (2001). **EFFECTS OF AQUACULTURE ON WORLD FISH SUPPLIES. ISSUES IN ECOLOGY 8: 12PP.**
- NELSON, C.R., HITES, R.A. (1980) **AROMATIC AMINES IN AND NEAR BUFFALO RIVER. ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY. 14: 1147:1149.**
- NIMENYA, H., DELAUNOIS, A., LA DUONG, D., BLODEN, S., DEFOUR, J., NICKS, B. & ANSAY, M., (1999). **SHORTTERM TOXICITY OF VARIOUS PHARMACOLOGICAL AGENTS ON THE IN VITRO NITRIFICATION PROCESS IN A SIMPLE CLOSED AQUATIC SYSTEM. ALTERNATIVE TO LABORATORY ANIMALS, 27, 1, P. 121-135.**
- NORMA MEXICANA NMX-AA-110-1995-SCFI **ANÁLISIS DE AGUA – EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON ARTEMIA FRANCISCANA KELLOGG (CRUSTACEA – ANOSTRACA) – METODO DE PRUEBA.**
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM -089-ECOL-1994. **LIMITES MAXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES EN LAS DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES A CUERPOS RECEPTORES PROVENIENTES DE LAS ACTIVIDADES DE CULTIVO ACUICOLA.**

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-065-ECOL-1994. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES EN LAS DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES A CUERPOS RECEPTORES PROVENIENTES DE LAS INDUSTRIAS DE PIGMENTOS Y COLORANTES.

NUNES S.B., CARVALHO D.F., GUILHERMINO M.L., VAN STAPPEN G. (2006). USE OF THE GENUS ARTEMIA IN ECOTOXICITY TESTING. ENVIRONMENTAL POLLUTION 144 453-462.

O'MAHONY, T.; GUIBAL, E.; TOBIN, J.M. (2002). REACTIVE DYE BIOSORPTION BY RHIZOPUS ARRHIZUS BIOMASS. ENZYME AND MICROBIOLOGY TECHNOLOGY, 31: 456.

OBIEKEZIE, A., AND N. OKAFOR. (1995). TOXICITY OF FOUR COMMONLY USED CHEMOTHERAPEUTIC COMPOUNDS TO FRY OF THE AFRICAN CATFISH, CLARIAS GARIEPINUS (BURCHELL). AQUACULTURE RESEARCH 26:441-445.

OCAMPOS. L, A. AURÓ (1996). TERAPÉUTICA DE LAS ENFERMEDADES DE LOS PECES. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. SECRETARIA DEL MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA. EDIT. DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA F.M.Z.UNAM: 113-116.

OKAFOR, N., AND M. TAEGE. (1996). TOXICITY OF FOUR COMMONLY USED CHEMOTHERAPEUTIC COMPOUNDS ON HYBRID FRY OF AFRICAN CATFISH HETEROCLARIAS (HETEROBRANCHUS LONGIFILIS X CLARIAS GARIEPINUS). JOURNAL OF AQUACULTURE IN THE TROPICS 11:113-118.

OLIVEIRA, C.S.D. (2006). PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS DOS FOTOSSENSIBILIZADORES CRISTAL DE VIOLETA E AZUL DE METILENO EM SISTEMAS MICROHETEROGÊNEOS E EM CÉLULAS CANCEROSAS EM CULTURA. -DOUTORADO-. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO,

ORELLANA G, VILLÉN L. Y JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ M. E. (2006). DESINFECCIÓN MEDIANTE FOTOSSENSIBILIZADORES: PRINCIPIOS BÁSICOS. PROYECTO PPQ2000-0778-C02. LABORATORIO DE FOTOQUÍMICA APLICADA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. SOLAR SAFE WATER. (15). PP: 16

- PACHECO GÓMEZ, JESÚS DAVID. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA (CL50) DEL EXTRACTO DE POLVILLO DE CARBÓN FRENTE A LARVAS DE ARTEMIA FRANCISCANA. CARTAGENA, COLOMBIA. 2011. PRESENTADA EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA EN CONVENIO CON LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA DEPARTAMENTO DE MEDICINA PARA LA OBTENCIÓN DE MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA. 70 P.**
- PASCOE D, SHAZILI. (1986). EPISODIC POLLUTION--A COMPARISON OF BRIEF AND CONTINUOUS EXPOSURE OF RAINBOW TROUT TO CADMIUM. DEC; 12(3):189-98.
- PEACHEY, R. L., & CROSBY, D. G. (1996). MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH, 42, 359-362.
- PÉREZ P. O. Y LAZO F. J. (2010). ENSAYO DE ARTEMIA: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES. REV. PROTECCIÓN VEG. VOL. 22 NO. 1: 34-43
- PIERRARD M.A., KESTEMONT P., DELAIVE E., DIEU M., RAES M., SILVESTRE F. (2012). MALACHITE GREEN TOXICITY ASSESSED ON ASIAN CATFISH PRIMARY CULTURES OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS BY A PROTEOMIC ANALYSIS. AQUATIC TOXICOLOGY 114- 115. 142- 152. DISPONIBLE EN:
[HTTP://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0166445X12000707](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X12000707)
- PILLAY, T.V.R. (1992). AQUACULTURE AND THE ENVIRONMENT. OXFORD, FISHING NEWS BOOKS, BLACKWELL, 189 P.
- PILLAY, T.V.R. (1996). THE CHALLENGES OF SUSTAINABLE OF AQUACULTURE. WORLD AQUACULT., 27(2):7-9
- PULLIN, R.S.V., H. ROSENTHAL & J.L. MACLEAN (COMPS.) (1993). ENVIRONMENT AND AQUACULTURE IN DEVELOPING COUNTRIES. ICLARM CONF.PROC., (31): 359 P.
- R. M. REEMA, P. SARAVANAN, M. DHARMENDIRA KUMAR & S. RENGANATHAN (2011): ACCUMULATION OF METHYLENE BLUE DYE BY GROWING LEMNA MINOR, SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY, 46:6, 1052-1058
- RAE. (2001). "DICCIONARIO DE LA LENGUA ESPAÑOLA", EDICIÓN 22, REAL ACADEMIA ESPAÑOLA Y ASOCIACIÓN DE ACADEMIAS DE LA LENGUA ESPAÑOLA, [HTTP://WWW.RAE.ES](http://www.rae.es).

- RAMÍREZ R. P. Y MENDOZA C. A. (2008). ENSAYOS TOXICOLÓGICOS PARA LA EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS EN AGUA Y SUELO. LA EXPERIENCIA EN MÉXICO. SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA. MÉXICO, D.F. ISBN: 978-968-817-882-9. P. 414
- RAO K.V.K. (1995). INHIBITION OF DNA SYNTHESIS IN PRIMARY RAT HEPATOCYTE CULTURES BY MALACHITE GREEN: A NEW LIVER TUMOR PROMOTER. TOXICOLOGY LETTERS 81 107-113. SSCI 0378-4274(95)03413-F
- RAZ, G. A. (2000). CRUSTÁCEOS Y POLIQUETOS. P. 265-307. EN: ORGANISMOS INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA Y DE LA CONTAMINACIÓN (BIOINDICADORES). DE LA LANZA, E. G., HERNÁNDEZ, P. S. Y CARBAJAL, P. J. L. (EDS). PLAZA Y VALDÉS. MÉXICO. 633 PP.
- RENWICK A., LEBLANC J.C., WOODROW S. R. (2010). APPLICATION OF THE MARGIN OF EXPOSURE (MOE) APPROACH TO SUBSTANCES IN FOOD THAT ARE GENOTOXIC AND CARCINOGENIC. EXAMPLE: LEUCOMALACHITE GREEN. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY 48 S75–S80.
- REPORT SERIES NO. 71. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, PUBLIC HEALTH SERVICE, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, RESEARCH TRIANGLE PARK, NC (IN PRESS).
- RIFICI, L. M., CHERRY, D. S., FARRIS, J. L. AND CAIRNS, J. (1996), ACUTE AND SUBCHRONIC TOXICITY OF METHYLENE BLUE TO LARVAL FATHEAD MINNOWS (PIMEPHALES PROMELAS): IMPLICATIONS FOR AQUATIC TOXICITY TESTING. ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, 15: 1304–1308. DOI: 10.1002/ETC.5620150807
- RIVA M.C., VILASECA M., CRESPI M. (1988). BIODEGRADABILIDAD, TOXICIDAD Y ACUMULACIÓN DEL COLORANTE ACIDO AZUL OMEGACROMO LN LA TRUCHA ARCO IRIS (SALMO GAIRDNERI). BOL. INTERTAR. N° 93. 55-70
- RODRÍGUEZ-IBARRA E. L., DE LA PARRA M.I., RODRÍGUEZ-MONTES G., PADILLA-AGUIAR C.Y., ZEPEDA MERCADO V. Y., VELASCO-BLANCO G. & GARCÍA-AGUILAR N. (2011). EFECTO DE LA ACRIFLAVINA, FORMALINA Y GLUTARALDEHÍDO SOBRE LA DESINFECCIÓN Y LA ECLOSIÓN DE LOS HUEVOS DEL BOTETE DIANA SPHOEROIDES ANNULATUS. REVISTA DE BIOLOGÍA MARINA Y OCEANOGRFÍA. VOL. 46, N°1: 59-65.

- ROLDÁN P. G. (1999). LOS MACROINVERTEBRADOS Y SU VALOR COMO INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA. REV. ACAD. COLOMB. CIENC. 23(88): 375-387. ISSN 0370-3908
- ROOTH, J. (1965). THE FLAMINGOS IN BONAIRE (NETHERLANDS ANTILLES). HABITAT, DIET AND REPRODUCTION OF PHOENICOPTERUS RUBERRUBER. UITGAVE NATUURWETENSCHAPPELIJKE STUDIEKRING VOOR SURINAME EN DE NEDERLANDSE ANTILLEN, UTRECHT, 41:171.
- RUHLAND, D. (1954). DER WIRKMECHANISMUS DES RADIOMETRISCHEN ZELLKERNGIFTES TRYPAFLAVIN. WISSENSCHAFTLICHE ZEITSCHRIFT DER UNIVERSITÄT HALLE, MATHEMATISCHNATURWISSENSCHAFTLICHE RUNDSCHAU, GERMANY 1:83– 85.
- SAGARPA. (2011). CONAPESCA (COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA). ANUARIO ESTADÍSTICO DE PESCA, MÉXICO, D.F.
- SÁNCHEZ-FORTÚN, S., SANZ-BARRERA, F., BARAHONA-GOMARIZ, M.V. (1995). ACUTE TOXICITIES OF SELECTED INSECTICIDES TO THE AQUATIC ARTHROPOD ARTEMIA SALINA. BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 54, 76-82.
- SÁNCHEZ-SALDAÑA L., SÁENZ A. E. (2005). ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES. EDUCACIÓN MÉDICA CONTINUA. DERMATOLOGÍA PERUANA; VOL 15: NO 2. P. 82-103
- SATO, N., J. MALLO Y J. FENUCCI. (2004). CALIDAD DE LOS QUISTES DE ARTEMIA PERSIMILIS (PICCINELLI Y PROSDOCIMI) (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA) DE DIFERENTES ZONAS DE ARGENTINA, COMO ALIMENTO EN ACUICULTURA. BIOLOGÍA MARINA Y OCEANOGRAFÍA 39(2): 79-92.
- SCHÄPERCLAUS, W. (1990). FISCHKRANKHEITEN. 5., BEARBEITETE AUFLAGE. AKADEMIE-VERLAG, BERLIN, GERMANY.
- SCHMIDT, A.S., BRUUN, M.S., DALSGAARD, I. & LARSEN, J.L. (2001). INCIDENCE, DISTRIBUTION, AND SPREAD OF TETRACYCLINE DETERMINANTS AND INTEGRON-ASSOCIATED ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES AMONG MOTILE AEROMONADS FROM A FISH FARMING ENVIRONMENT. APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 67: 5675– 5682.
- SHARMA, Y.C., (2011). ADSORPTION CHARACTERISTICS OF ALOW-COST ACTIVATED CARBÓN FOR THE RECLAMATION OF COLORED EFFLUENTS CONTAINING MALACHITE GREEN. J.CHEM.ENG. DATA 56,478–484.

- SIRES, I., GUIVARCH E., OTURAN, N., OTURAN, M.A. (2008). EFFICIENT REMOVAL OF TRIPHENYLMETHANE DYES FROM AQUEOUS MEDIUM BY IN SITU ELECTROGENERATED FENTON'S REAGENT AT CARBON-FELT CATHODE. CHEMOSPHERE. 72: 592-600.
- SMITH, P., HINEY, M.P. & SAMUELSEN, O.B., (1994). BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL AGENTS USED IN FISH FARMING: A CRITICAL EVALUATION OF METHOD AND MEANING. ANNU. REV. FISH DIS., 4: 273-313.
- SONCIN M., C. FABRIS, A. BUSETTI, D. DEI, D. NISTRI, G. RONCUCCI & G. JORI. (2002). APPROACHES TO SELECTIVITY IN THE ZN-PHTHALOCYANINE-PHOTOSENSITIZED INACTIVATION OF WILD-TYPE AND ANTIBIOTIC-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS, PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. SCI., 1, 815-819.
- SORGELOOS, P. (1979). THE BRINE SHRIMP, ARTEMIA SALINA: A BOTTLENECK IN MARICULTURE: 321-324. IN: FAO TECHNICAL CONFERENCE ON AQUACULTURE, KYOTO 1976. PILLAY, T.V.R.; DILL, WM. A. (EDS). FISHING NEWS BOOKS LTD., FARNHAM, ENGLAND, 653 PP.
- SORGELOOS, P. ET AL., (1987). ARTEMIA RESEARCH AND IT APPLICATIONS. MORPHOLOGY, GENETICS. STRAIN CHARACTERIZATION, TOXICOLOGY. UNIVERSA PRESS. BELGIUM. 300 PP.
- SOTO, D., & NORAMBUENA, F. (2004). EVALUATION OF SALMON FARMING EFFECTS ON MARINE SYSTEMS IN THE INNER SEAS OF SOUTHERN CHILE: A LARGE-SCALE MENSURATIVE EXPERIMENT. JOURNAL OF APPLIED ICHTHYOLOGY. 20: 493-501.
- SPANGENBERG, R. (1975). ORIENTIERENDE UNTERSUCHUNGEN U"BER DAS VORKOMMEN VON MYXOBAKTERIEN BEI DER KIEMENNEKROSE DES KARPENS. ZEITSCHRIFT FU" R BINNENFISCHEREI DER DDR, GERMANY 22:121-127.
- SRIVASTAVA S., SINHA R., 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. AQUATIC TOXICOLOGY, 31, 241-247.
- STEINERT, S. A., MONTEE, R. S., & SASTRE, M. P. (1998). MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH, 46, 355-358.

- STEINERT, S. A., MONTEE, R. S., & SASTRE, M. P. (1998). MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH, 46, 355–358.
- STOCHE R.M., GARCÍA L.V., DOS REIS M.P., KLAMT J.G. & ÉVORA P.R.B. (2004). METHYLENE BLUE TO TREAT ANAPHYLAXIS DURING ANESTHESIA. CASE REPORT. REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA. 54: 809-814
- STOCKERT, J.C., HERKOVITS, J. (2003). PHOTODYNAMIC TOXICITY AND ITS PREVENTION BY ANTIOXIDATIVE AGENTS IN BUFO ARENARUM EMBRYOS. ELSELVIER TOXICOLOGY. ISSN 0300-483X. VOL. 192, NO. 2, PAGES 211-218
- SUBASINGHE, R.P., BARG U. & TACON, A. (1996). CHEMICALS IN ASIAN AQUACULTURE: NEED, USAGE, ISSUES AND CHALLENGES. IN: USE OF CHEMICALS IN AQUACULTURE IN ASIA. ARTHUR, J.R., C.R. LAVILLA-PITOGO, R. P. SUBASINGHE (EDS). SOUTHEAST ASIAN FISHERIES DEVELOPMENT CENTER, AQUACULTURE DEPARTMENT TIGBAUAN, ILOILO, PHILIPPINES. PP 1-6.
- SUDOVA, E., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z., VESELY, T. (2007). NEGATIVE EFFECTS OF MALACHITE GREEN AND POSSIBILITIES OF ITS REPLACEMENT IN THE TREATMENT OF FISH EGGS AND FISH: A REVIEW. MED. VET. 52 (12), 527–539.
- SVOBODOVA, Z., GROCH, L., FLAJSHANS, M., VYKUSOVA, B., MACHOVA, J. (1997). EFFECT OF LONG-TERM THERAPEUTIC BATH OF MALACHITE GREEN ON COMMON CARP (CYPRINUS CARPIO). ACTA VET. BRNO 66 (2), 111–116.
- SVOBODOVA, Z., J. BULINOVA, B. MACHOVA, B. VYKUSOVA, & R. FAINA. (1986). THE TOXICITY OF SELECTED ORGANIC DYES TO AQUATIC ORGANISMS. PR. VYZK. USTAV RYB. HYDROBIOL. VODNANY15(): 52-60
- TIENSONGRUSMEE B, S BUDILEKSONO, S CJHANSTARASRI, SKY YUWONO & H SANTOSO. (1989). PROPAGATION OF SEABASS, LATES CALCARIFER IN CAPTIVITY. SEAFARMING DEVELOPMENT PROJECT, UNDP/FAO/INS/81/008/MANUAL/15, PP. 1-55.
- TOMKINS S.P. & DANN L. (2009). SEXUAL SELECTION IN BRINE SHRIMPS PRACTICAL INVESTIGATIONS USING ARTEMIA FRANCISCANA. BIOSCIENCE EXPLAINED. VOL. 5 NO. 1. P: 22 DISPONIBLE EN: WWW.BIOSCIENCE-EPLAINED.ORG
- TONGUTHAI K, CHANRATCHAKOOL P. (1992). THE USE OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS IN AQUACULTURE IN THAILAND, PP. 555-565.

- TÖRÖKNÉ, A., VASDINNYEI, R. & ASZTALOS, B. M. (2007), A RAPID MICROBIOTEST FOR THE DETECTION OF CYANOBACTERIAL TOXINS. ENVIRON. TOXICOL., 22: 64-68. DOI: 10.1002/TOX.20235
- TORRES GARCÍA PABLO. QUÍMICA DE COORDINACIÓN DE LIGANDOS DERIVADOS DE 1,3-TIAZINA, PIRAZOL Y PIRAZOL-3,5-DISUSTITUIDOS. CONSIDERACIONES ESTÉRICAS. EDICIÓN: UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA. SERVICIO DE PUBLICACIONES. (2010). PRESENTADA EN UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA. MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS.
- TOXICITY AND CARGINOGENICITY OF MALACHITE GREEN AND LEUCOMALACHITE GREEN, IN: NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM TECHNICAL REPORT 527 DISPONIBLE EN: [HTTP://WWW.EHP.NIEHS.NIH.GOV/NTP/DOCS](http://www.ehp.niehs.nih.gov/ntp/docs)
- TRANTAPHYLIDIS, G. V, K. POULOPOULOU., T.J, ABATZOPOULOS" C.A. PINLO-PÉREZ & P. SORGELOOS. (1995). SALINITY EFFECTS ON SURVIVAL, MATURITY, GROWTH, BIOMETRICS, REPRODUCTIVE AND LIFESPAN CHARACTERISTICS OF A BISEXUAL AND PARTHENOGENETIC POPULATION OF ARTELLZIA. HYDROBIOLOGIA 302: 215-227.
- TROVATO C., CROSTA C. ENDOMICROSCOPIA: PRESENTE E FUTURO. (2011). DIVISIONE DI ENDOSCOPIA ISTITUTO EUROPEO DI ONCOLOGIA DI MILANO. INIZIATIVE FORMATIVE TECNICHE ENDOSCOPICHE. GIORN ITAL END DIG; 34:213-219
- TUCKER JW. (1998). MARINE FISH CULTURE, 750 PP. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BOSTON.
- TUITE, E.M.; KELLY, J.M. (1993). PHOTOCHEMICAL INTERACTIONS OF METHYLENE BLUE AND ANALOGUES WITH DNA AND OTHER BIOLOGICAL SUBSTRATES. J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. B, V.21, N.2-3, P.103-24
- U.S. FOOD DRUG ADMINISTRATION. (2003). GUIDELINE FOR INDUSTRY: MASS SPECTROMETRY FOR CONFIRMATION OF THE IDENTITY OF ANIMAL DRUG RESIDUES, FEDERAL REGISTER 68 25617-25618.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, (1985). "METHODS FOR MEASURING THE ACUTE TOXICITY OF EFFLUENTS TO FRESHWATER AND MARINE ORGANISMS". W.H. PELTIER AND C.I. WEBER (EDS.)

- US.EPA. (1994). METHODS FOR ASSESSING THE TOXICITY OF SEDIMENT-ASSOCIATED CONTAMINANTS WITH ESTUARINE AND MARINE AMPHIPOD. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. EPA/600/R-94/025.
- USEPA (2002). METHODS FOR MEASURING THE ACUTE TOXICITY OF EFFLUENTS AND RECEIVING WATERS TO FRESHWATER AND MARINE ORGANISMS, 5A ED. US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, OFFICE OF WATER (4303T). NW. WASHINGTON, DC 20460. EPA-821-R-02-012, 266 P.
- VALIELA, I. (1995). MARINE ECOLOGICAL PROCESSES, 2ND ED. SPRINGER. BOSTON
- VANHAECKE P., PERSOONE G. (1981). STANDARDIZED SHORT TERM TOXICITY TEST WITH ARTEMIA NAUPLII (ARC-TEST). INSERM VOL. 106. LES TESTS DE TOXICITÉ EN MILIEU AQUATIQUE. PP. 359-376
- VANHAECKE, P., S. E. SIDDAL & P. SORGELOOS. (1987). XXII. COMBINED EFFECTS OF TEMPERATURE AND SALINITY ON THE SURVIVAL OF ARTEMIA OF VARIOUS GEOGRAPHICAL ORIGIN. INTERNATIONAL STUDY ON ARTEMIA. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY, 98: 167-183.
- VARGAS F., RIVAS C. (2004). LAS APLICACIONES CLÍNICAS DE FOTOTERAPIA. LABORATORIO DE FOTOQUÍMICA, CENTRO DE QUÍMICA, INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS I.V.I.C., APARTADO 21827. DERMATOLOGÍA VENEZOLANA. VOL. 42, Nº 4. P:5.
- VIARO F, DALIO MB, EVORA PR. (2002). CATASTROPHIC CARDIOVASCULAR ADVERSE REACTIONS TO PROTAMINE ARE NITRIC OXIDE/CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE DEPENDENT AND ENDOTHELIUM MEDIATED: SHOULD METHYLENE BLUE BE THE TREATMENT OF CHOICE?. CHEST; 122:1061-1066
- WAINWRIGHT M., PHOENIX A. D, RICE L., BURROW M.S., WARING J. (1997). INCREASED CYTOTOXICITY AND PHOTOTOXICITY IN THE METHYLENE BLUE SERIES VIA CHROMOPHORE METHYLATION. JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY 40 233-239.
- WAINWRIGHT M., (2001). ACRIDINE—A NEGLECTED ANTIBACTERIAL CHROMOPHORE. JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. 47, 1-13

- WAINWRIGHT M., PHOENIX D.A., MARLAND J., WAREING D.R.A., BOLTON F.J. (1997). A STUDY OF PHOTOBACTERICIDAL ACTIVITY IN THE PHENOTHIAZINIUM SERIES. PUBLISHED BY ELSELVIER SCIENCE. B.V. FEMS. IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY 19 75-80. PII S0928-8244 (97) 00070-9.
- WARANUSANTIGUI P., POKETHITIYOOK P., KRUATRACHUE M. & UPATHAM E.S. (2003). KINETIC OF BASIC DYE (METHYLENE BLUE) BIOSORPTION BY GIANT DUCKWEED (SPIRODELA POLYRRHIZA). ENVIRONMENTAL POLLUTION. 125: 385-392.
- WATT B.E., PROUDFOOT A.T., BRADBERRY S.M. & VALE J.A. (2005). POISONING DUE TO UREA HERBICIDES. TOXICOLOGICAL REVIEWS. 24: 161-166.
- WHO/FAO (1964) JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE: SPECIFICATIONS FOR IDENTIFY AND PURITY AND TOXICOLOGICAL EVALUATION OF FOOD COLOUM. FAO NUTRITION MEETINGS REPORT SERIES 3813. GENEVA; FOOD ADDITIVES SERIES 66.25. GENEVA
- WILLIAMS, W. D. Y M. C. GEDDES. (1991). ANOSTRACANS FROM AUSTRALIANS SALT LAKES, WITH PARTICULAR REFERENCES TO A COMPARISON OF PARARTEMIA AND ARTEMIA. EN: R.A. BROWNE, P. SORGELOOS Y C.N.A. TROTMAN (EDS.). ARTEMIA BIOLOGY: 351-368. (CRC PRESS, BOCA RATON, FLORIDA, USA).
- YAN LU, RUIQING JIAO, XIAOPING CHEN, JIEYING ZHONG, JIANGUO JI, & PINGPING SHEN. (2008). METHYLENE BLUE-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY INDUCES MITOCHONDRIA-DEPENDENT APOPTOSIS IN HELA CELL. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 105:1451-1460.
- YANG C., HAMEL C., VUJANOVIC V. & GAN Y. (2011). FUNGICIDE: MODES OF ACTION AND POSSIBLE IMPACT ON NON TARGET MICROORGANISMS. INTERNATIONAL SCHOLARLY RESEARCH NETWORK ISRN ECOLOGY VOLUME 2011, ARTICLE ID 130289, P. 8 DOI:10.5402/2011/130289.
- YAO J, ZHANG GJ. (1996). LOSS OF LYSOSOMAL INTEGRITY CAUSED BY THE DECREASE OF PROTON TRANSLOCATION IN METHYLENE BLUE-MEDIATED PHOTSENSITIZATION. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 1284:35-40.

ZAHN, T., BRAUNBECK, T. (1995). CYTOTOXIC EFFECTS OF SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF MALACHITE GREEN IN ISOLATED HEPATOCYTES FROM RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS). TOXICOL. IN VITRO 9 (5), 729–741.

ZHANG LZ, TANG GQ. (2005). THE BINDING PROPERTIES OF PHOTSENSITIZER METHYLENE BLUE TO HERRING SPERM DNA: A SPECTROSCOPIC STUDY. J PHOTOCHEM PHOTOBIO B 74:119–125.