

39  
Zey



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

472  
21/12

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE GLUTATION, GRADO  
DE LIPOPEROXIDACION Y ACTIVIDAD DE LIPASA, PARA  
EVALUAR EL EFECTO TOXICO DEL DODECILBENCENSULFONATO  
DE SODIO (DBSS) Y METIL PARATION SOBRE EL  
METABOLISMO DE *Moina macrocopa*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A N :**

**ELENA GUADALUPE OLVERA HERNANDEZ**

**ALEJANDRO CHEHUE ROMERO**

ASESORES: M. en C. BEATRIZ RAMIREZ MORA  
Dra. LAURA MARTINEZ TABCHE  
Q.F.I. LETICIA ZUÑIGA RAMIREZ



V N A M

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO**

1995.

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO...

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Determinación de los niveles de Glutación, Grado de Lipoperoxidación y Actividad de Lipasa para evaluar el efecto tóxico del Dodecibencensulfonato de sodio (DBSS) y Metil Paratión sobre el metabolismo de *Molna macrocopa*.

que presenta la pasante: Elena Guadalupe Olvera Hernández con número de cuenta: 8608113-9 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con : Alejandro Chehue Romero

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Agosto de 1995

PRESIDENTE Q.F.B. Maricela Noé Martínez

VOCAL Q.F.I. Leticia Zuñiga Ramirez

SECRETARIO Q.F.B.M. Eugenia R. Posada Galarza

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Virginia Oliva Argüello

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Lidia Rafael Trujano

*[Firmas manuscritas de los miembros del jurado]*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
 AVENIDA DE  
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
 DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la F.E.E. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Determinación de los niveles de Glutación, Grado de Lipoperoxidación y Actividad de Lipasa, para evaluar el efecto tóxico del Dodecylbencensulfonato de sodio (DBSS) y Metil Paratión sobre el metabolismo de *Molina macrocopa*.

que presenta el pasante: Alejandro Chehue Romero  
 con número de cuenta: 8958825-9 para obtener el TITULO de: Químico Farmacéutico Biologo ; en colaboración con: Elena Guadalupe Olvera Hernández

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Agosto de 1995

PRESIDENTE	Q. F. B. Maricela Noé Martínez	<i>Maricela Noé</i>
VOCAL	Q. F. I. Leticia Zuñiga Ramírez	<i>Leticia Zuñiga</i>
SECRETARIO	Q. F. B. No. Eugenia R. Posada Galarza	<i>Eugenia R. Posada</i>
PRIMER SUPLENTE	Q. F. B. Virginia O. y Arellano	<i>Virginia O. y Arellano</i>
SEGUNDO SUPLENTE	Q. F. B. Julia R. ...	<i>Julia R. ...</i>

## DEDICATORIAS

Gracias a Dios, por la oportunidad mas grande que me ha brindado: LA VIDA.

A mis padres:

Irene Romero Martinez

Jose Leonardo P. Gpe. Balderas Hernandez.

La influencia mas grande que he tenido. Por ellos existo y a ellos dedico cada uno de los triunfos alcanzados, como un tributo a su cariño, comprension, apoyo y confianza.

A mis hermanos:

Juan Carlos, Guillermo, Jose Eduardo y Raquel

Que siempre han estado cerca de mi y han hecho sentir la union de nuestra familia en los momentos dificiles para poder salir adelante.

A Elena

Por todo lo que compartimos juntos y por el apoyo que siempre me has brindado, Te Quiero.

A mis amigos

Por los momentos más agradables que pasamos juntos en la escuela y fuera de ella.

Alejandro. 1

## DEDICATORIAS

A mis padres Concepción y Roberto por darme la oportunidad de Vivir y por su Amor, en especial a ella que me ha ayudado a superar muchas dificultades y ser mi más Grande AMIGA.

A mi hermana Patricia por su protección, amistad y haberme impulsado a seguir siempre adelante.

A mi hermano Luis por su Cariño y Comprensión y a Beto por enseñarme a reir de los problemas.

A Alejandro por su Apoyo y Amor, que me han ayudado a superar muchos problemas y por que he compartido con él momentos maravillosos.

A todos mis compañeros y amigos en especial a Ma. Eugenia, Veronica, Luz Ma. y Carolina por saberme escuchar y participar en todas mis Locuras.

Y por que en la vida de todo ser humano existe un circulo cerrado, también a ellos.

A Dios por darme la esperanza y fuerza para seguir adelante.

Elena G.

## AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan por habernos dado la oportunidad de ser unos profesionistas.

A nuestras Asesoras.

M en C. Beatriz Ramírez Mora, por el tiempo invertido y por su dedicación para que este trabajo se terminara, por su gran amistad admiración y respeto que le tenemos.

Dra. Laura Martínez Tabche, por su apoyo y colaboración en la realización de esta tesis y el tiempo que nos dedico.

Q.F.I. Leticia Zuñiga Ramírez, por sus consejos y sobre todo por su paciencia al apoyarnos en la FES-C.

Agradecemos a todos nuestros profesores, en especial a Anita Velazco, Enrique Angeles, Ma. Esther Revueltas, Ma. Eugenia Posadas, Teresa Ramírez y Efrén Hernández, por su paciencia y dedicación a cada uno de nosotros.

*Elena y Alejandro.*

Hay hombres que luchan un día y son buenos,  
hay otros que luchan un año y son mejores,  
hay quienes que luchan muchos años y son muy buenos,  
pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles.

Berlín, Ditch



ESTE TRABAJO SE REALIZO BAJO LA DIRECCION DE LA M. en C. BEATRIZ RAMIREZ MORA Y DE LA DRA. LAURA MARTINEZ TABCHE EN EL LABORATORIO DE TOXICOLOGIA ACUATICA, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL I. P. N.

## INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 Evaluación de la calidad del agua residual.	4
1.1.1 Parámetros indicadores de la contaminación del agua.	4
1.1.2 Monitoreo biológico de la contaminación acuática.	4
1.1.3 Bioensayo.	6
1.2 <i>Moina macrocopa</i> .	7
1.2.1 Morfología.	7
1.2.2 Reproducción.	10
1.2.3 Ciclo de vida.	10
1.2.4 Importancia de <i>Moina macrocopa</i> en pruebas toxicológicas.	11
1.3 Detergentes.	13
1.3.1 Propiedades y estructura química del Dodecilsulfonato de sodio (DBSS).	13
1.3.2 Toxicocinética.	15
1.4 Plaguicidas.	17
1.4.1 Metil Paratión.	17
1.5 Glutación.	21
1.5.1 Características químicas del Glutación.	21
1.5.2 Biosíntesis del Glutación.	22
1.5.3 Mecanismo de detoxificación.	23
1.6 Lipoperoxidación.	24
1.6.1 Origen de los radicales libres del oxígeno.	25
1.6.2 Origen endógeno.	25
1.6.3 Origen exógeno.	26
1.6.4 Química de la Lipoperoxidación.	26
1.6.5 Protectores de radicales libres.	27
1.7 Lipasa.	29

1.8 Validación.	32
2. OBJETIVOS.	34
3. MATERIAL Y METODOS.	35
3.1 Material biológico.	35
3.2 Determinación de proteínas en el sobrenadante de <i>Moina m.</i> por el método de Bradford.	
3.2.1 Reactivos.	36
3.2.2 Procedimiento.	36
3.2.3 Curva de calibración.	36
3.3 Método analítico de adición estándar.	37
3.3.1 Preparación de soluciones.	37
3.3.2 Procedimiento.	38
3.3.3 Determinación in vitro de los niveles totales de GSH de <i>Moina m.</i> en presencia de DBSS y Metil Paratión.	39
3.4 Determinación del grado de Lipoperoxidación.	39
3.4.1 Preparación de soluciones para la curva estándar.	39
3.4.2 Procedimiento	41
3.4.3 Extracción de Lípidos	41
3.4.4 Reacción con TBA.	41
3.4.5 Determinación in vitro del grado de Lipoperoxidación en presencia de DBSS y Metil Paratión.	42
3.5 Determinación de la actividad de Lipasa.	42
3.5.1 Preparación de soluciones	42
3.5.2 Procedimiento.	43
3.5.3 Determinación in vitro de la actividad de Lipasa en presencia de DBSS y Metil Paratión.	44
4. RESULTADOS.	

4.1	Determinación de proteínas por el Método de Bradford.	45
4.2	Efecto tóxico del DBSS sobre los niveles de GSH en <i>Moina m.</i>	47
4.3	Efecto tóxico del Metil Paration sobre los niveles de GSH en <i>Moina macrocopa.</i>	49
4.4	Efecto tóxico del DBSS sobre el grado de Lipoperoxidación en <i>Moina macrocopa.</i>	51
4.5	Efecto tóxico del Metil Paration sobre el grado de Lipoperoxidación en <i>Moina m.</i>	53
4.6	Efecto tóxico del DBSS sobre la actividad de la Lipasa en <i>Moina m.</i>	55
4.7	Efecto tóxico del Metil Paration sobre la actividad de Lipasa en <i>Moina macrocopa.</i>	57
5.	DISCUSION.	59
6.	CONCLUSIONES.	63
	APENDICE I. - GLOSARIO	64
	APENDICE II. - Desarrollo y Validación para los métodos analíticos para la determinación de los Niveles de Glutación y Grado de Lipoperoxidación.	66
7.	BIBLIOGRAFIA.	83

## INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1 Características morfológicas de la <i>Moina macrocopa</i> .	9
Fig. 2 Orientación de grupos polares en un detergente aniónico.	15
Fig. 3 Síntesis del Dodecilsulfonato de sodio (DBSS)	16
Fig. 4 Estructura química del Glutatión.	21
Fig. 5 Biosíntesis del Glutatión.	22
Fig. 6 Hidrolisis enzimática para la liberación de ácidos grasos.	31
Fig. 7 Curva estandar de proteínas.	46
Fig. 8 Efecto del DBSS sobre los niveles totales de Glutatión.	48
Fig. 9 Efecto del Metil Paratión sobre los niveles totales del Glutatión.	50
Fig. 10 Efecto del DBSS sobre el grado de lipoperoxidación.	52
Fig. 11 Efecto del Metil Paratión sobre el grado de Lipoperoxidación.	54
Fig. 12 Efecto del DBSS sobre la actividad de la Lipasa.	56
Fig. 13 Efecto del Metil Paratión sobre la actividad de la Lipasa.	58
Fig. 14 Linealidad del sistema para Lipoperoxidación.	71
Fig. 15 Linealidad del sistema para Glutatión.	76
Fig. 16. Linealidad del método para Glutatión.	78

## INDICE DE CUADROS.

1. Agentes contaminantes presentes en el agua dulce.	2
2. Composición química de un detergente.	13
3. Clasificación de plaguicidas.	17
4. Clasificación de insecticidas	19
5. Especies reactivas del oxígeno.	24
6. Reacciones que generan radicales libres de oxígeno.	25
7. Composición química del agua dulce sintética para el cultivo de <i>Moina macrocopa</i> .	35
8. Curva de calibración para la determinación de proteínas.	37
9. Determinación de proteínas por el método de Bradford.	45

10. Efecto del DBSS sobre los niveles totales de Glutación en <i>Moina macrocopa</i> .	47
11. Efecto del Metil Paratión sobre los niveles totales del Glutación en <i>Moina macrocopa</i> .	49
12. Efecto del DBSS sobre el grado de lipoperoxidación en <i>Moina macrocopa</i> .	51
13. Efecto del Metil Paratión sobre el grado de Lipoperoxidación en <i>Moina macrocopa</i> .	53
14. Efecto del DBSS sobre la actividad de la Lipasa en <i>Moina macrocopa</i> .	55
15. Efecto del Metil Paratión sobre la actividad de la Lipasa en <i>Moina macrocopa</i> .	57
16. Resultados estadísticos del análisis de varianza (ANADEVA) para la linealidad del sistema de Lipoperoxidación.	67
17. Valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TEP) estandar en solución acuosa.	67
18. Resultados estadísticos del análisis de varianza (ANADEVA) para la linealidad del sistema de Glutación.	73
19. Valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de Glutación estandar en solución acuosa.	73
20. Valores de la cantidad adicionada de Glutación y cantidad recuperada de GSH en el homogeneizado de <i>Moina macrocopa</i> .	77
21. Resultados estadísticos del análisis de varianza (ANADEVA) para la linealidad del método.	77
22. Porcentajes de recobro de Glutación obtenidos por dos analistas en dos diferentes días.	81
23. Resultados estadísticos del análisis de varianza (ANADEVA) para evaluar la precisión del método.	81

# Introducción

## 1 INTRODUCCION.

El agua es, junto con el aire que respiramos, el patrimonio máspreciado de la humanidad. Actualmente, mas de dos mil millones de seres humanos, carecen de suministros de agua potable y el desarrollo acelerado de metrópolis gigantescas como lo es la Ciudad de México, aunado al crecimiento demográfico, no hace mas que incrementar la demanda del preciado liquido.

El agua es el principal componente de todos los organismos vivos ya que constituye cerca del 70% en peso del cuerpo humano y 95% en algunas plantas (Curtis, 1983). Tres cuartas partes de la superficie terrestre estan cubiertas por agua, la mayor cantidad se localiza en océanos, representando el 97.2%; el agua dulce ocupa el 2.8%, encontrandose la mayor parte en los casquetes polares y en las nieves de las cordilleras. El agua disponible en el mundo, se encuentra en rios, lagos, arroyos, manantiales y depósitos subterráneos, lo que es el 0.63% del total; el 0.02% restante se encuentra en la atmósfera (Vizcaino, 1986). Actualmente es conocida la importancia de los cuerpos acuáticos tanto desde el punto de vista economico en lo que se refiere a transportación y comercio, así como el de constituir una vasta reserva de alimentos, minerales y energéticos (Contreras, 1984), además de tener un papel fundamental en los ciclos de agua e intervenir en la regulación de la temperatura y climas de la tierra (Curtis, 1983).

La industrialización, a costa de daños irreversibles al medio ambiente aire, tierra y agua ha dejado de ser una estrategia viable para acceder a mejores condiciones de vida.

Esta situación, adquiere una dimensión enorme cuando se identifican las tensiones a las que se encuentran sometidos los ambientes acuáticos ya que, los niveles de contaminación que tienen actualmente, son considerados como uno de los problemas mas graves a nivel mundial, debido a la gran cantidad y variedad de sustancias tóxicas, provenientes tanto de origen industrial como urbano que son vertidos a ellos anualmente. Dichos contaminantes, ya sea en forma



individual o combinada, son altamente nocivos para la salud humana y para todas las formas de vida acuática existente en la tierra.

Los organismos acuáticos representan actualmente la mejor propuesta que existe para establecer el alimento en los próximos años a la creciente población humana. Es por esto la gran importancia de cuidar de estos recursos naturales, tanto desde el punto de vista alimenticio como para evitar mayores daños sobre la Ecología del planeta.

Se han identificado cerca de mil quinientas sustancias que contaminan a los ecosistemas que radican en el agua dulce (Masson, 1984), pero en general se clasifican como se muestra en la Cuadro 1.

Cuadro 1 AGENTES CONTAMINANTES PRESENTES EN EL AGUA DULCE	
-	Detergentes
-	Gases
-	Fertilizantes y abonos
-	Metales
-	Sustancias radiactivas
-	Grasas y dispersantes de grasas.
-	Pesticidas.

La materia orgánica, aceites, grasas, detergentes, plaguicidas y metales pesados son los principales contaminantes que modifican la calidad natural del agua en México. (SEDUE, 1988).

Es importante mencionar que muchos contaminantes se bioconcentran a lo largo de la cadena alimentaria, ya que aun cuando los organismos primarios son expuestos a concentraciones muy bajas de xenobióticos, estos se encuentran en concentraciones elevadas en niveles mas altos de la cadena, ya que la ingestión de partículas en suspensión o alimentos contaminados depende de los hábitos alimentarios de cada uno de los hidrobiontes. (Sayer, 1992).

Sin embargo, existe poca información acerca de los efectos biológicos que pueden generar los diferentes contaminantes en los

distintos niveles tróficos, como resultado de la bioconcentración que se lleva a cabo en cada uno de ellos (Martínez T.L. et al., 1990).

Los efectos tóxicos de los contaminantes químicos, depende de la biodisponibilidad y persistencia, de la capacidad de los organismos para acumularlos o eliminarlos y de la interferencia de tales compuestos con procesos bioquímicos, fisiológicos y/o ecológicos específicos (Capuzzo, 1988).

Cuando un contaminante está presente en el medio acuático puede presentar alteraciones bioquímicas, por ejemplo en la actividad enzimática, en los niveles de proteínas y de lípidos, activación o inhibición de rutas metabólicas, en las membranas, en la composición de tejidos y fluidos del organismo, estos cambios pueden afectar procesos fisiológicos como la digestión, el consumo de oxígeno, la conducción del impulso nervioso, la síntesis de hemoglobina y la detoxificación. Estos cambios pueden ocurrir dentro de un período que abarca desde unos cuantos minutos hasta días, dependiendo de la intensidad y frecuencia de exposición del contaminante (Payne et al., 1987 y Vernberg, et al 1981).

Los contaminantes interactúan con los ecosistemas, produciendo modificaciones en ambos sentidos. Algunos en cantidades tienen efectos biestimuladores que se traducen en incrementos en la productividad de los ecosistemas, sin embargo, la mayoría de estos xenobióticos tienen con frecuencia efectos nocivos aun en pequeñas concentraciones, tal es el caso de pesticidas, hidrocarburos y compuestos radiactivos. (Masson, 1984).

## 1.1 Evaluación de la calidad del agua residual.

Generalmente a las aguas residuales se les aplican tratamientos para la remoción, inactivación, descomposición de sólidos en suspensión, materia orgánica y microorganismos presentes, de esta manera son eliminados a diferentes cuerpos de agua, sin embargo es importante demostrar la efectividad del tratamiento. El problema para el manejo de límites permisibles de los contaminantes solos o en mezclas es la complejidad en la interacción de factores antropogénicos y naturales. El estudio se basa principalmente en bioensayos con tóxicos aislados o los que comprenden las consecuencias biológicas de la interacción de cientos de ellos lo cual es difícil de evaluar, para estimar el daño en el sistema ecológico. Por lo tanto las confederaciones encargadas de la protección ambiental (EPA, SEDESOL), deben considerar los riesgos que se van a correr con la metodología existente para establecer límites, de aquí surge la necesidad de encontrar pruebas que sean útiles con propósitos de regulación y monitoreo de efluentes, que muestren la efectividad de un proceso de tratamiento, siendo estas metodologías fundamentales para la elaboración de un plan integral de reducción en la toxicidad.

### 1.1.1 Parámetros indicadores de la contaminación del agua.

Los parámetros indicadores que permiten conocer la calidad del agua, sin importar su uso, ni procedencia, además de dar una idea acerca del grado de contaminación de las aguas residuales, sirven como criterios para determinar los procedimientos mas adecuados para su tratamiento y como base de diseño para las dimensiones de los equipos de depuración. Para su estudio, se clasifican en físicos; (temperatura, sólidos totales, materia flotante, sólidos filtrables, color, olor), químicos; (pH, demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), metales pesados). Parámetros microbiológicos; (coliformes totales). (EPA, 1982)

### 1.1.2 Monitoreo biológico de la contaminación acuática.

La evaluación de la calidad de agua a través de indicadores físicos, químicos y microbiológicos, no provee de la información suficiente sobre el efecto de productos tóxicos y/o mezclas de estos en la comunidad biológica de un medio acuático, por lo que es importante anexar estudios empleando indicadores biológicos que son organismos que determinan las características en que se encuentran, estos pueden presentar respuestas: fisiológicas, morfológicas, conductuales, histológicas, entre otras (Sheehan, 1984). El monitoreo biológico es una herramienta que permite determinar el impacto de los contaminantes en factores: físicos, químicos y bióticos en el ambiente. La información obtenida a través de programas de monitoreo biológico está siendo utilizada para proveer de datos sobre cambios en estuarios y ecosistemas, permite la toma de decisiones para el control de la contaminación y justifica las acciones que se tomen. Para realizar un monitoreo biológico es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones: Llevar a cabo una encuesta en el área de trabajo, antes de decidir cuales serán las especies sensibles, métodos y sitios para el monitoreo; Se debe incluir áreas de control para cambios naturales; (Baker 1976), plantea las siguientes posibilidades en cuanto a la selección de organismos:

- Centinelas. Son organismos que se introducen en el ambiente, se diseñan como indicadores de daño temprano para medir el alcance del impacto de los contaminantes y el área afectada en donde existen efluentes contaminados.
- Detectores. En este grupo se incluyen especies que muestran una respuesta medible a contaminantes o cambios ambientales como: muerte, modificación en el crecimiento, reproducción o en el comportamiento.
- Exploradores. Son organismos cuya presencia indica la probabilidad de contaminación. Son frecuentemente abundantes, en áreas contaminadas desaparecen.

- Acumuladores. El organismo que se emplea en el estudio de productos químicos acumulados en cantidades medibles.
- Organismos de Bioensayo. Organismos seleccionados como reactivo de laboratorio para detectar la presencia y/o concentración del contaminante o para designar el orden de toxicidad del contaminante.

### 1.1.3 Bioensayo.

Bioensayo, es el término con el que se conoce la exposición controlada de organismos y sus condiciones ambientales, a sustancias puras o mezclas de ellas, durante un periodo determinado de tiempo, para conocer el efecto que estas tienen sobre el comportamiento de los organismos expuestos: reproducción, movilidad, crecimiento, mortalidad, etc. (SEDESOL, 1992). Son diversos los bioensayos que se realizan para determinar la toxicidad de compuestos químicos en efluentes tanto en especies silvestres y cultivadas, así como organismos acuáticos que presentan diferentes niveles tróficos. Estas pruebas permiten tener una estimación del impacto que se produce en los ecosistemas naturales o aquellos modificados por el hombre. Para estos ensayos se ha dispuesto de diversos tipos de organismos como indicadores tal es el caso de las bacterias (Espigares et al, 1990), algas (Horning y Webber, 1985), invertebrados (Nikunen y Miettinen, 1985), oligoquetos acuáticos (Chapman y Brinkhurst, 1984), peces (Peltier y Webber, 1985), en donde se evalúa principalmente el parámetro  $CL_{50}$  o modificaciones de este, donde el 50% de los organismos mueren o son afectados a ciertas concentraciones de un químico para un tiempo de exposición particular bajo condiciones ambientales específicas (Little et al, 1990). Sin embargo, este bioindicador no evalúa el impacto de los contaminantes que puedan provocar modificaciones a diversos niveles de complejidad funcional debido a la existencia de fenómenos compensatorios que no permiten observar una respuesta clara (Espigares et al, 1990; Frumin et al, 1992; Hinton et al, 1987).

## 1.2 MOINA MACROCOPA

Los cladoceros son un grupo abundante y de gran importancia en la naturaleza, en los ecosistemas acuáticos son la principal fuente de nutrientes entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores. Estos organismos son filtradores no selectivos, en condiciones naturales se alimentan de fitoplanctón, bacterias y detritos finos (materia orgánica) y son depredados por varias especies carnívoras tales como juveniles de peces y zooplantófagos en general (Conklin, 1978, y Gutierrez, V. A. 1990).

El crustáceo *Moina macrocopa* es un organismo que vive en agua dulce. Pertenece al Phylum Arthropoda, Clase Crustácea, Orden Cladocera. Es una especie cosmopolita ampliamente distribuida en ríos y lagos. En Hong Kong es común en estanques pequeños, en cultivos de arroz y es cultivado en masa por granjeros piscícolas para el alimento de los peces. (Wong, 1990).

Este crustáceo puede ser encontrado durante las diferentes estaciones del año. Su amplia distribución, en una gran variedad de cuerpos de agua se debe a la producción de epiptios, los cuales son fácilmente distribuidos por el viento y los animales. La presencia de vegetación acuática es importante ya que aumenta la cantidad de algas y bacterias con las cuales se alimenta.

### 1.2.1 Morfología.

Mide aproximadamente de 0.2 a 0.7mm. su cuerpo es de forma oval, comprimido, no está perfectamente segmentado y sólo se diferencian dos partes: cabeza y tronco. Fig. 1

La cabeza está constituida por cinco pares de apéndices, un ojo compuesto y un ojo nauplio. El primer par lo constituyen las antenas que poseen quimiorreceptores y surgen del margen ventral de la cabeza, marcan el dimorfismo sexual, ya que en los machos son grandes y curvas, con ellas sujetan a la hembra durante la cópula, en tanto en esta última son cortas y rectas. El segundo par de apéndices

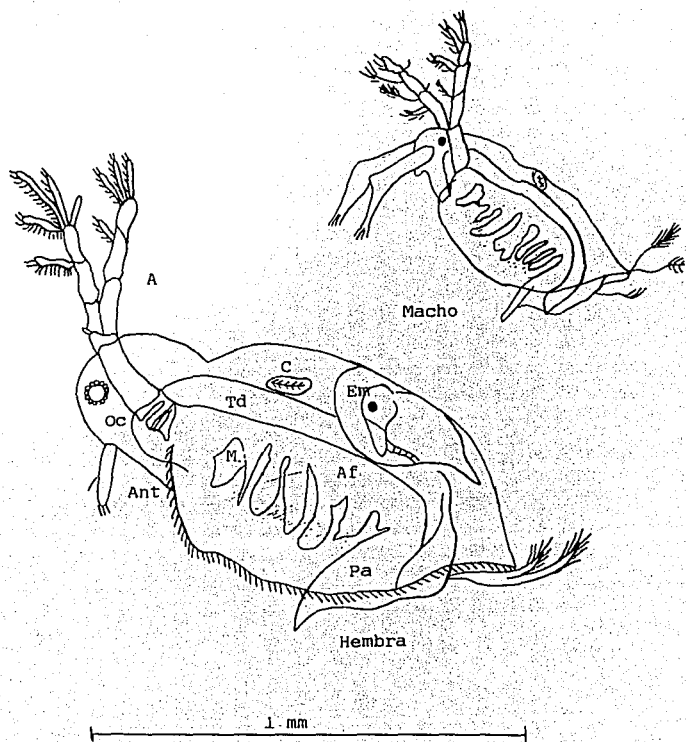
están constituidos por las antenas, que son estructuras grandes, articuladas y móviles que se insertan a cada lado de la cabeza, actúan como el principal órgano de locomoción, al presentar movimientos descendentes el crustáceo se desplaza rápidamente, mientras que con movimientos ascendentes se desplaza en forma lenta. El tercer, cuarto y quinto pares de apéndices se encuentran transformados como estructuras bucales detrás de la cabeza y continuando se extiende el caparazón que encierra el tronco y que también es transparente y quitinoso. La boca es pequeña, se localiza cerca de la unión del tronco y la cabeza, está formada por diminutas mandíbulas romas seguidas de dos pares de máximas y apéndices birrámeos aplanados que utiliza para respirar y filtrar partículas de alimento procedente del agua.

Los movimientos de las antenas producen corrientes de agua que llevan los alimentos hacia la boca en donde son divididos y pasan al esófago. El esófago es corto y se une al intestino medio, que recorre la longitud del cuerpo y termina en el ano que se sitúa en el segmento terminal.

A nivel del dorso se encuentra una separación formando un seno pericárdico que contiene al corazón, el cual carece de arterias y venas.

Las hembras poseen ovarios pareados cerca del intestino medio; los huevos partenogénicos son puestos mediante conductos que se abren dorsalmente en una bolsa de incubación entre la parte posterior del cuerpo y el caparazón, los huevos permanecen ahí hasta que se convierten en pequeños organismos parecidos a sus progenitores. (Ville, 1985).

Los machos se pueden distinguir por que son de menor tamaño que las hembras, usualmente un tercio del tamaño de éstas, sus anténulas son más largas, por lo tanto el movimiento es más rápido, presentan modificaciones postabdominales y los apéndices anteriores ostentan un gancho utilizado en la cópula. (Civleva, 1973).



Af Apendice filtrador.  
 C Corazon.  
 Em Embrión.  
 Td Tubo digestivo.  
 Pa. Postabdomen.  
 Oc. Ojo Compuesto.

A Antena  
 Ant. Antenula  
 M Mandibula

Fig. 1 Características morfológicas de *Molna macrocopa*.



### 1.2.2 Reproducción.

Los cladóceros presentan dos tipos de reproducción, la sexual se lleva a cabo cuando las condiciones ambientales son adversas, es decir que exista una alta densidad de población, acumulación de productos de desecho o bajas temperaturas, estas condiciones favorecen las condiciones de los machos y aparición de huevos sexuales en envoltorios llamados epiplas. (Martínez J.F. and Gutiérrez, V.A. 1991).

La reproducción asexual es la más frecuente durante el ciclo de vida de los cladóceros, debido a que las poblaciones están principalmente constituidas por hembras, las cuales se reproducen por partenogénesis que ocurre en condiciones ambientales óptimas (Ivleva 1973).

### 1.2.3 Ciclo de vida.

El promedio de longevidad de *Moina macrocopa*, es de cuarenta días a 25°C y alrededor de 56 días a 20°C. El ciclo de vida incluye cuatro etapas que son:

- a) **Huevo.** Se desarrollan dentro de la cámara de incubación y los neonatos son liberados aproximadamente en dos días.
- b) **Juvenil.** El tiempo necesario para que los juveniles tengan su primera descendencia es entre seis y diez días, el crustáceo tiene de cuatro a seis estadios, cada una de estas etapas termina con una muda e inmediatamente después ocurre el crecimiento, cuando el nuevo exoesqueleto aun es elástico.
- c) **Preadulto.** Este período consiste solo de un estadio en el cual ocurre el completo desarrollo de los huevos dentro del ovario, generalmente, los huevos son liberados a la cámara de cría minutos después de mudar y las crías en desarrollo son liberadas justo antes de la siguiente muda.

d) Adulto. *Moina macrocopa* tiene de 6 a 22 estadios adultos cuya duración aumenta con la edad, depende del medio ambiente, cada estadio finaliza con cuatro eventos importantes que son: Liberación de crías de la cámara de crianza, muda, aumento de tamaño y la liberación de una nueva crianza a la cámara. Puede llegar a producir entre 6 y 10 crías durante cada estadio, aunque a veces pueda ser de 50, el mayor número de crías ocurre en el quinto estadio después del cual disminuye (Martínez, 1988).

#### 1.2.4 Importancia de *Moina macrocopa* en pruebas Toxicológicas.

*Moina macrocopa* por poseer características muy similares a *D. magna*, organismo ampliamente utilizados en estudios toxicológicos, es considerada como una especie útil en estudios de la evaluación de la calidad del agua y como representante general de los organismos zooplactónicos de agua dulce por las siguientes peculiaridades:

- a). Sensibilidad a los tóxicos ambientales: se ha comprobado que la *Moina macrocopa* es sensible a sustancias tóxicas como metales pesados (dicromato de potasio, cobre, cadmio, plomo y cromo), insecticidas, etanol y fenoles (Ivleva, 1973, y Denner, 1988).
- b). Ciclo de vida corto: el ciclo de vida del crustáceo, desde la entrada a la cámara de cría hasta la muerte como adulto, es muy variable y depende de las condiciones ambientales (Pennak 1978), su ciclo de vida es de 40 días a 25°C y de 56 días a 20°C (Ivleva 1973).
- c). Son partenogénicos: cuando las condiciones son favorables el crustáceo se reproduce por partenogénesis. En este tipo de reproducción las hembras solo producen huevos que dan origen a hembras, presentando estas las mismas características de las progenitoras, particularmente esto les confiere una gran importancia para los estudios de toxicidad, ya que al presentar las mismas características se puede asegurar la sensibilidad ante las presencia de sustancias tóxicas, también favorece la constante producción de juveniles útiles en las pruebas de toxicidad.

- d). Su fácil manejo: la *Moina m.* alcanza una talla máxima de 2mm, un gran número de ellas se puede cultivar en un espacio pequeño y con poca cantidad de agua (Martínez, J.F. 1988).
- e). Otras características que permiten su utilización son: el presentar un mayor control de enfermedades, su transportación no es complicada; son fáciles de alimentar; el costo de las pruebas es significativamente menor que la de los peces (Martínez, J.F. 1988).

### 1.3 DETERGENTES

Los detergentes son contaminantes comunes del agua, ya que tienen un elevado consumo doméstico e industrial, debido a su propiedad de separar partículas de suciedad adheridas, conservandolas en disolución o suspensión. Estos productos han sustituido a los detergentes naturales y en la actualidad acaparan el 80% del mercado mundial.

Un detergente esta constituido básicamente de un agente tensoactivo y de agentes auxiliares que aumentan su actividad, como son silicatos y boratos (abrasivos), blanqueadores ópticos y fosforatos. Cuadro 2.

Compuesto activo de superficie (Hidrocarburo)	10-40%
Tripolifosfato de sodio	25-50%
Sulfato de sodio	5-10%
Carboxi metil-celulosa	1%
Silicato de sodio	2-10%
Blanqueador óptico	trazas

#### 1.3.1 Propiedades y Estructura Química del Dodecilsulfonato de Sodio (DBSS)

Los detergentes son sustancias con propiedades tensoactivas con la capacidad de disminuir la tensión superficial. El carácter tensoactivo de los detergentes ayuda a la penetración, emulsificación, dispersión y formación de espuma, ya que están formados por moléculas con propiedades hidrofílicas (polares) e hidrofóbicas (no polares). (Martín, 1967. Morrison y Boyd, 1985).

esto les permite tender a formar agregados en las interfases: aire-agua y aceite-agua. lo cual reduce la tensión superficial y facilita la emulsificación. Fig. 2

Actualmente existen varios tipos de detergentes sintéticos para el lavado y otras aplicaciones. Los mas comunes son: sales de ácidos sulfónicos, clasificados como detergentes aniónicos, ya que el extremo polar de la molécula es un anión alquilsulfonado. Para aplicaciones mas especializadas se utilizan otros dos tipos de detergentes sintéticos. Los detergentes catiónicos que se basan en estructuras de sal de amonio cuaternario, polialcoholes y poliésteres que encuentran aplicación como detergentes neutros.

Los detergentes son obtenidos a partir de productos de la destilación del petróleo, entre los mas importantes se encuentran: el alquil-bencen sulfonato lineal (LAS) y alquil-bencen sulfonato ramificado, siendo este último el de mayor uso comercial. Su síntesis se efectua a partir de un hidrocarburo aromático, generalmente el benceno y se fija sobre su núcleo una oleofina en presencia del catalizador apropiado de este modo se obtiene un hidrocarburo sustituido que se sulfona con ácido sulfúrico en exceso. La neutralización se realiza con sosa cáustica y se obtiene una mezcla de alquil-bencen-sulfonato y sulfonato de sodio. Los detergentes contienen otros elementos que incrementan su poder limpiador entre los que se encuentran: a) Fosfatos (trifosfato, fosfato disódico), b) Auxiliares (Carboximetil-celulosa; silicato de sodio, blanqueadores ópticos, etc.) Dentro de estos componentes los fosfatos tienen una proporción alta que puede ir desde 10-40% del producto, esta concentración se emplea para ayudar a la acción de los demás elementos, actuando como suavizadores del agua, debido a su capacidad de formar complejos coordinados con iones  $Ca^{2+}$  y otros cationes que imparten dureza al agua (Gutierrez, 1982). Fig. 3

El dodecibencensulfonato de sodio es un detergente sintético de tipo aniónico, el cual es frecuentemente utilizado en México en la elaboración de detergentes comerciales. Se presenta físicamente en forma de escamas blancas higroscópicas, sus soluciones acuosas son

neutras, las cuales son estables aun cuando se modifique la dureza del agua, son resistentes a la oxidación y a la hidrólisis, tanto ácida como alcalina (Cahn y Lynn, 1983).

### 1.3.2 Toxocinética.

La absorción de los detergentes en organismos acuáticos ocurre a través de las branquias y piel.

Su distribución es amplia abarcando todo el organismo, se encuentra en mayores concentraciones en branquias, vesícula biliar, tracto gastrointestinal, hígado, riñon y bazo, y en menor concentración en cerebro y músculo (Hazzarry, 1983).

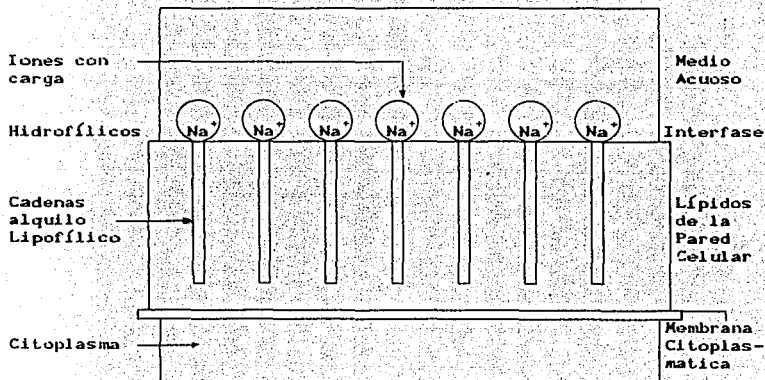
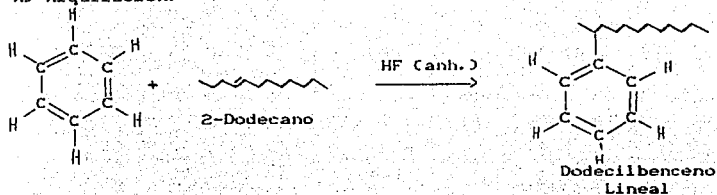
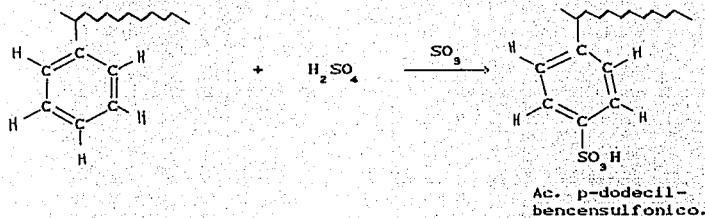


Figura 2 Orientación de grupos polares de un detergente aniónico (Gutierrez 1982)

A) Alquilación.



B) Sulfonación.



C) Neutralización.

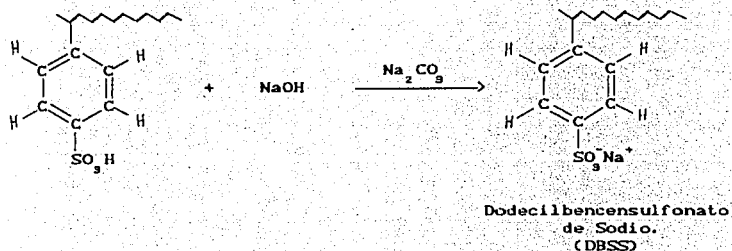


Figura 3 SINTESIS DEL DODECILBENCENSULFONATO DE SODIO (DBSS).

## 1.4 PLAGUICIDAS.

Considerando que el mayor volumen de los plaguicidas se destinan a la producción agrícola, es preciso señalar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños al ambiente, como son el deterioro de la flora y la fauna silvestre, la contaminación de suelos, mantos freáticos, aguas continentales y costeras. Debido a que tienen la propiedad de acumularse y de transportarse a través de las cadenas alimenticias pueden llegar al hombre (Diario oficial, 1991).

los plaguicidas contaminan los cuerpos acuáticos principalmente por escurrimientos de tierras sometidas a prácticas agrícolas aprobadas y de salud pública, pero también por derrames o por descargas deliberadas (desagües agrícolas y residuos de fumigaciones urbanas e industriales). Otra causa es la aplicación directa de los plaguicidas en el agua para prevenir enfermedades como son: malaria, oncocercosis y esquistosomiasis, o para controlar plagas: lirio acuático y lamprea marina entre otros. (Masson, 1984) Cuadro 3.

**Cuadro 3**  
**Clasificación de Plaguicidas**

- Insecticidas.
- Herbicidas.
- Rodenticidas.
- Fungicidas.
- Moluscocidas.
- Acaricidas.
- Nematicidas.
- Sustancias para fumigar.

### 1.4.1 Metil Paratión.

El metil paratión llamado O,O-dimetil-O-P-nitrofenilfosforotionato. Tiene un amplio espectro de actividad insecticida; su homólogo, el paratión, posee



## 1.4 PLAGUICIDAS.

Considerando que el mayor volumen de los plaguicidas se destinan a la producción agrícola, es preciso señalar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños al ambiente, como son el deterioro de la flora y la fauna silvestre, la contaminación de suelos, mantos freáticos, aguas continentales y costeras. Debido a que tienen la propiedad de acumularse y de transportarse a través de las cadenas alimenticias pueden llegar al hombre (Diario oficial, 1991).

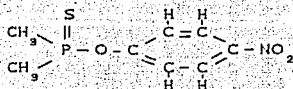
Los plaguicidas contaminan los cuerpos acuáticos principalmente por escurrimientos de tierras sometidas a prácticas agrícolas aprobadas y de salud pública, pero también por derrames o por descargas deliberadas (desagües agrícolas y residuos de fumigaciones urbanas e industriales). Otra causa es la aplicación directa de los plaguicidas en el agua para prevenir enfermedades como son: malaria, oncocercosis y esquistosomiasis, o para controlar plagas: lirio acuático y lamprea marina entre otros. (Masson, 1984) Cuadro 3.

Cuadro 3 Clasificación de Plaguicidas
<ul style="list-style-type: none"><li>- Insecticidas.</li><li>- Herbicidas.</li><li>- Rodenticidas.</li><li>- Fungicidas.</li><li>- Moluscocidas.</li><li>- Acaricidas.</li><li>- Nematicidas.</li><li>- Sustancias para fundar.</li></ul>

### 1.4.1 Metil Paratión.

El metil paratión llamado O,O-dimetil-O-P-nitrofenilfosforotionato. Tiene un amplio espectro de actividad insecticida; su homólogo, el paratión, posee

una alta toxicidad para los mamíferos  $DL_{50}$  (oral) para ratas 6.4 mg/kg y ha sido reemplazado por materiales menos tóxicos como son el metil paratión y el malatión (Cremlyn, 1986). La  $DL_{50}$  (oral) del metil paratión, en ratas, es de 12 mg/Kg (EPA, 1987).



### Estructura Química del Metil Paratión

Los nombres comerciales del metil paratión son Dalf, Folidol-M, Nitrox-80, Bladan M, su peso molecular es 263.2. en grado técnico, es un líquido amarillo pálido, fácilmente soluble en alcoholes, ésteres, hidrocarburos aromáticos; es prácticamente insoluble en agua (60 ppm) éter de petróleo, queroseno y aceites comunes pulverizados (The Merck Index, 1990; EPA, 1987)

Con el creciente uso de los plaguicidas para la producción agrícola y en especial en los tratamientos contra plagas, adquiere una gran importancia la interacción plaguicida-suelo-agua, por el impacto de estas sustancias en el ambiente (Diario oficial, 1991).

Algunos organofosforados como el paratión y el metil paratión, son insecticidas muy usados por que presentan un amplio intervalo de actividad insecticida y propiedades fisicoquímicas como (baja volatilidad, suficiente estabilidad en agua y en soluciones alcalinas), (Murphy, 1975).

En 1988, la fabricación nacional de este insecticida fue de cuatro mil toneladas (ingrediente activo cien por ciento) cubriendo la totalidad de las necesidades del país, representando el porcentaje mas alto (24.9%) en lo que se refiere a necesidades de acaricida e insecticida durante dicho año (SEDUE, 1988). Actualmente en México se permite el uso del metil paratión en cultivos de aculgás, aguacate, maíz, arroz, cacahuete, algodón, calabaza, sorgo,

camote, chabacanos, jitomate, mango y otros cultivos (Diario Oficial, 1991).

Organoclorados	Aldrin. Dieldrin. DDT. Toxafeno. Lindano. Clordano.
Organofosforados	Metil Paration. Paration. Diacinon. Malation. Diclorvos
Carbamatos	Baigón. Moban. Carbamilo. Servin. Temik
Vegetales	Nicotina. Piretinas. Rotenona.

En el agua el metil paration se hidroliza lentamente para dar p-nitrofenol y ácido ortotiofosforico. el tiempo que se requiere para hidrolizar el 50% varia entre 6 y 90 días, dependiendo el pH y la temperatura, siendo el menor en soluciones alcalinas (EPA, 1987). Este plaguicida se considera de vida residual corta, no es modificado por el oxígeno pero la fotosíntesis es un proceso determinante en el destino del metil paration en cuerpos de agua (EPA, 1987).

Estos organofosforados suelen dispersarse en forma de aerosol o de polvos que estan formados por el compuesto adsorbido en un material inerte en partículas muy finas, en consecuencia, estos compuestos se absorben rápida y eficazmente por el conducto gastrointestinal, la piel y las membranas mucosas cuando esta en forma líquida y por los pulmones cuando se inhalan los vapores.

polvos finamente dispersos o aerosoles (Goodman Y Gilman, 1987).

El metil paratión es metabolizado a metil paroxón por la desulfuración oxidativa "in vivo" por medio de la función mixta oxidasa microsomal (MFO) en los animales incluyendo a los insectos. esta reacción requiere como cofactor NADPH y oxígeno. El metil paroxón se desactiva subsecuentemente por medio de una hidrólisis catalizada por esterases formando dimetilhidrogenofosfato y p-nitrofenol. Por otra parte el metil paratión puede ser detoxificado por medio de una desarilación o una desmetilación a través de la MFO microsomal (Cremlyn, 1986; Casarett y Doull's, 1991; EPA, 1987).

Los insecticidas organofosforados inhiben aparentemente la acción de varias enzimas, pero la actividad mas importante in vivo es sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChasa). esta enzima hidroliza a la acetilcolina (ACh) que se genera en las uniones nerviosas hasta colina. en ausencia de ACh efectiva, la acetilcolina liberada se acumula e impide la transmisión continua de impulsos nerviosos a través del espacio sináptico en las uniones nerviosas.

La acetilcolina es un compuesto muy importante en el sistema nervioso tanto de los insectos como de los peces y los mamíferos, así que el mecanismo básico de acción de estos compuestos es el mismo en insectos que en animales superiores.

Ademas de la inactivación de la acetilcolinesterasa, algunos de estos agentes son capaces de fosforilar otras enzimas que se encuentran en el tejido nerviosos, como las llamadas esterases, debido a lo cual ocurren neuropatías, por la inhibición de esta enzima.

## 1.5 Glutation

En 1929, F. G. Hopkins descubrió el tripeptido Glutación (GSH) y lo reconoció como un constituyente de la mayor parte sino de todas las células. En el interior de las células animales el compuesto se encuentra habitualmente presente en una concentración aproximadamente de 1-5mM. Se encuentra en niveles inferiores en las bacterias. También aparece en las plantas verdes y en los hongos.

### 1.5.1 Características químicas.

El glutación es un tripeptido atípico (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina). (Fig.4) en el cual el glutamato N-terminal está unido a la cisteína a través de un enlace peptídico no  $\alpha$ , es usualmente el más prevalente thiol intracelular, ya que participa en diferentes funciones directa o indirectamente, en importantes fenómenos biológicos, incluyendo la síntesis de proteínas y ADN, transporte, actividad enzimática, metabolismo y protección de células. (Anderson 1983; Murray y col. 1988).

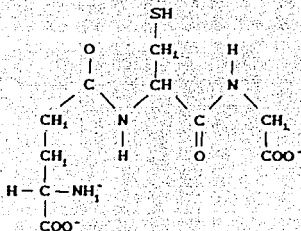
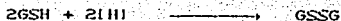


Fig. 4 Glutación (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina.)

Las características químicas más interesantes del glutación son el enlace  $\gamma$ -glutamilo y la presencia de un grupo SH libre. Este último puede oxidarse para formar un puente disulfuro que une a dos moléculas de glutación.

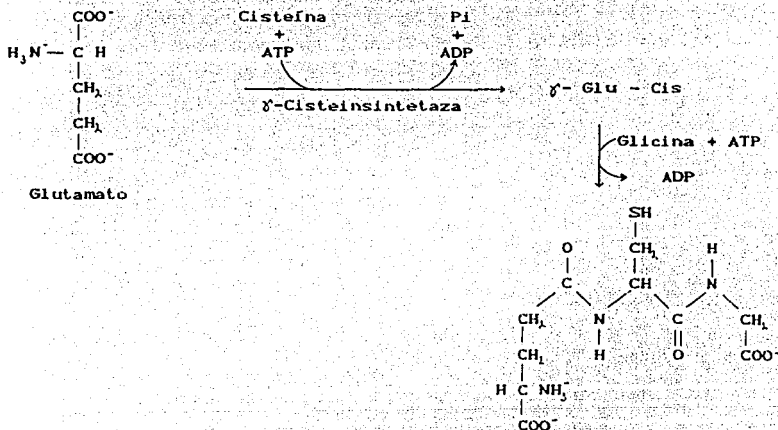


Son estas propiedades químicas las que han atraído la atención de los bioquímicos sobre el glutatión como agente reductor intracelular, cuya función primaria puede ser el proteger los grupos SH de las proteínas manteniendolas reducidas. El glutatión desempeña también el papel específico en la reducción del peróxido de hidrógeno como mecanismo de detoxificación.

### 1.5.2 Biosíntesis de GSH.

En la primera etapa de síntesis de GSH es la formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del glutamato y del grupo amino de la cisteína, la formación del enlace peptídico requiere que se active un grupo carboxilo, se consigue con ATP, el intermediario acilfosfato es atacado después por el grupo amino de la cisteína esta reacción es retroinhibida por GSH. (Anders, M.W., et al. 1988).

La segunda etapa es catalizada por la glutatión sintetasa, el ATP activa al grupo carboxilo de la cisteína para permitir condensación con el grupo amino de la glicina. Fig. 5

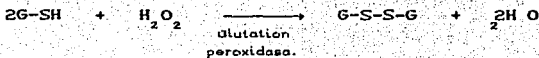
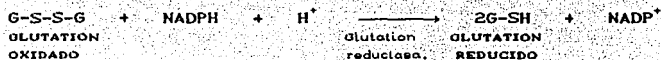


Glutation reducido GSH ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina)

Fig.5 Biosíntesis del Glutatión.

### 1.5.3 Mecanismo de Detoxificación.

El mecanismo se lleva por medio de la vía de la pentosafosfato en el eritrocito proporciona NADPH para la reducción del glutatión oxidado (G-S-S-G) a glutatión reducido (2G-SH), catalizada por la glutatión reductasa. A su vez, el glutatión remueve  $H_2O_2$  del eritrocito en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa.



## 1.6 Lipoperoxidación.

La lipoperoxidación consiste en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y de los lípidos constituyentes del tejido y este proceso está asociado con el daño celular y la muerte. (Valenzuela, 1983). La lipoperoxidación mediante los radicales libres es considerado el primer mecanismo de la destrucción celular (Yalcin A. 1986).

Se ha propuesto que el daño producido por los radicales libres generados endogenamente es el mayor factor que contribuye al envejecimiento y a los procesos degenerativos asociados a él, incluyendo el cáncer, enfermedades del corazón y también a una multitud de procesos patológicos. La etiología de estos agentes en el daño celular son: procesos inflamatorios, daño por radiación y en la toxicidad de algunos químicos. (Fraga y Col. 1991, Jeffrey 1993). In vivo, los radicales de oxígeno son producidos principalmente mediante el metabolismo normal a partir de la actividad de las células fagocíticas y durante la producción lipídica. (Fraga y col., 1990).

Estos radicales son capaces de participar en reacciones subsecuentes y dar lugar a la producción de otros radicales entre los que se encuentran el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales hidroxilo (OH) y, de menor importancia al oxígeno univalente (Cuadro 5).

$O_2^-$	Radical anión superóxido
$HO_2^-$	Radical hidropéroxido.
$H_2O_2$	Péroxido de hidrógeno.
$OH^-$	Radical hidroxilo.
$ROO^-$	Radical péroxido (R=lipido)
$O_2$	Oxígeno univalente.



### 1.6.1 Origen de los radicales libres del oxígeno.

El origen de los radicales libres de oxígeno puede ser exógeno o endógeno.

### 1.6.2 Origen endógeno.

Los radicales de oxígeno se pueden originar de células con actividad fagocítica como los neutrofilos (polimorfonucleares), monocitos y macrófagos, eosinófilos y células endoteliales.

El sistema oxidativo de NADPH es responsable de la generación de radicales superóxido. Este, da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno a través de una reacción intracelular de dismutación que se lleva a cabo en forma más eficiente a través de la acción de una dismutasa de actividad barridora o eliminadora de radicales libres de oxígeno (una oxidasa dependiente de NADPH) y que da lugar a la reducción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) a ion superóxido ( $O_2^-$ ). Por otro lado, el radical superóxido también es capaz de reducir todos los complejos que contienen Fe al estado ferroso (Cuadro 6).

Cuadro 6	
Reacciones que generan radicales libres de oxígeno	
1.	$2O_2 + 2H \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
2.	$Fe^{3+} + O_2 \longrightarrow (Fe^{3+} - O_2 / Fe^{2+} - O_2) \quad Fe^{2+} + O_2$
3.	$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH + OH^- + Fe^{3+}$

1. A través de la superóxido dismutasa.  
2. Reducción de complejos formados por Fe y  $O_2$ .  
3. Reacción de Fenton.

El Fe participa en tres formas diferentes dentro del proceso oxidativo 1) Facilita la descomposición de peróxidos lipídicos y da lugar a la producción de sustancias entre las que se encuentran los aldehídos tóxicos y gases hidrocarbonados; 2) Promueve la

generación de radicales hidroxilos a través de la vía peróxido de hidrógeno y 3) participa en los procesos de generación del radical superóxido y peróxido de hidrógeno al acelerar la oxidación no enzimática de moléculas como la epinefrina y el glutatión.

### 1.6.3 Oxígeno exógeno.

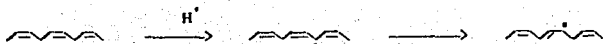
Este es diverso y quizás mucho mayor de lo que hasta ahora se conoce. Algunas sustancias como el paraquat, aloxano y doxorubicina poseen propiedades oxidoreductoras mientras que el paracetamol es capaz de inducir reacciones de oxidación. El cigarrillo, las reacciones ionizantes, la exposición de los rayos solares y sustancias oxidantes como el glutatión dan lugar a la formación de radicales libres de oxígeno.

### 1.6.4 Química de la Lipoperoxidación.

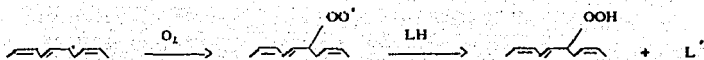
El papel de la lipoperoxidación es el primer evento y un mecanismo básico en la toxicidad para un amplio espectro de químicos.

La lipoperoxidación ha sido definida como un deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados, que dan lugar a radicales libres de lípidos e hidropéroxidos semiestables, los cuales promueven las oxidaciones en cadena de radicales libres. Estas reacciones proceden en 3 diferentes etapas. La primera es el proceso de iniciación en el cual las radicales de lípidos se generan. El segundo es una serie de reacciones de "propagación", en el cual el número de radicales libres se conserva a medida que las reacciones de peroxidación proceden. Finalmente hay una serie de reacciones de "terminación" por los cuales los radicales libres se destruyen. Los tres pasos de la lipoperoxidación son descritos como a continuación se muestra en forma simplificada. (LH = lípidos poliinsaturados; L<sup>•</sup> = Radical Lipídico; LO<sup>•</sup> = Radical Hidropéroxido lipídico):

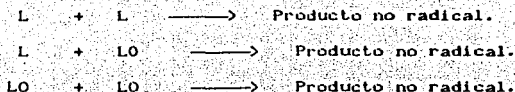
### Iniciación:



### Propagación:



### Terminación:



Para controlar y reducir la peroxidación lipídica, tanto los seres humanos como la naturaleza, usan los antioxidantes. Galato de propilo, butilato de hidroxianisol (BHA) y butilato de hidroxitolueno (BHT) que son antioxidantes como aditivos en los alimentos.

En la peroxidación de los lípidos, el malondialdehído es el único compuesto formado por los ácidos grasos con tres o más dobles ligaduras y se emplea como una medida de la peroxidación de los mismos.

### 1.6.5 Protectores de Radicales Libres.

Los organismos aeróbicos pueden desarrollar una serie de protectores endógenos de radicales libres, y también para el daño producido por la inducción de algunos xenobióticos. (Jeffrey 1993)

#### Grupos Tíol.

El GSH es protector en varios pasos en la reacción en cascada de los radicales libres. La disminución de GSH por una variedad de xenobióticos semejantes a acetaminofen, bromobenceno y un agente experimental dietilmaleato, los cuales provocan Lipoperoxidación (LPO).

Dos enzimas son el componente esencial del efecto del GSH sobre los radicales libres. Glutación peroxidasa, cataliza la reducción de hidroperóxidos a componentes no reactivos.



donde XOOH puede ser hidroperóxido lípido o peróxido de hidrógeno.

La segunda enzima, glutación S-transferasa, cataliza la reacción de GSH con reactivos electrofílicos, semejante a los generados por el metabolismo microsomal de acetaminofen o hidrocarburos aromáticos halogenados. (Suha Yalcian, 1986)

#### *Otros Protectores.*

La Superóxido dismutasa (SOD) es la enzima llave para la detoxificación de superóxidos. La catalasa. La vitamina A, C y E tienen propiedades antioxidantes. La deferoxamina (DFO), el Mannitol, y el Oxígeno Hiperbárico (HBO). (Jeffrey A. 1993)

## 1.7 Lipasa.

Se ha sugerido que los procesos bioquímicos de organismos acuáticos sean empleados en programas de monitoreo, ayudando a la detección de la contaminación en sus etapas iniciales. Cada estrato trófico tiene el potencial de reflejar un cambio en la calidad del agua, desde un nivel molecular, celular o a todo el organismo, llegando hasta el componente más alto.

Los indicadores basados en reacciones enzimáticas pueden considerarse sensibles para evaluar el daño ambiental, ya que una o pocas reacciones enzimáticas parecen ser el blanco para muchos compuestos tóxicos, al no existir una amplia variedad de ellas, de su empleo, es posible obtener relaciones concentración-respuesta, las cuales pueden incorporarse a modelos de calidad ambiental para predecir efectos biológicos de niveles de contaminación o para monitorear los efectos del medio ambiente real (Ahmmand y Ramana, 1980; Martínez et al, 1991; Martínez et al 1992).

La composición de los lípidos de una membrana (Ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, esfingomielinas, glicoesfingolípidos, colesterol) es característica del tipo, el estado y la edad fisiológica de esta.

Las lipasas son una clase de enzimas que hidrolizan triacilglicéridos en la interfase aceite/agua, y se encuentra ampliamente distribuida en animales, plantas y microorganismos. (Stocklein W. 1993).

El cladocero *Moina macrocopa*, almacena grandes cantidades de lípidos, principalmente triacilglicéridos. (Farkas 1970, Goulden and Hornig 1980). El triacilglicérido está almacenado en gotas dentro de células en la cavidad del cuerpo del animal.

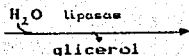
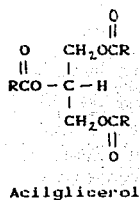
En las células vivas, las enzimas llamadas LIPASAS realizan la hidrólisis, se caracteriza por cierto grado de especificidad, de modo

que las distintas lipasas actúan de modo preferencial sobre diferentes enlaces éster.

Los ácidos grasos se encuentran en enlace éster formando acilgliceroles (gliceridos), fosfoacilgliceroles y esfingolípidos. Esos lípidos dejan libres sus ácidos grasos por acción de hidrolasas llamadas lipasas. Fig. 6

Una vez roto el enlace éster, los ácidos grasos libres pueden ser degradados para obtener carbono, energía o ambas cosas, o bien ser reutilizados en la biosíntesis de diversos lípidos, incluso de la clase a la que pertenecían antes de su liberación. Por ahora se enfocará su catabolismo hasta  $CO_2$ . Ciertos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como el ácido araquidónico, puede usarse para la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. (Bohinski 1991).

Cada aplicación requiere propiedades específicas de la lipasa con respecto al sustrato específico, estabilidad, temperatura dependencia del pH en la actividad o habilidad de la catalisis de la reacción de síntesis de éster en solventes orgánicos.

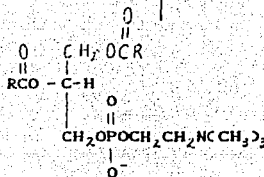


Liberacion de ac. grasos



reutilizacion  
o degradación

fosfolipasas  
glicerilfosforilcolina



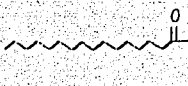
en otras estructuras RC- se representa como 

Fig. 6 Hidrolisis enzimatica para la liberación de ácidos grasos.

## 1.8 VALIDACION.

La validación es un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en un análisis químico. El método seleccionado es analizado con una prueba estadística, a una serie de experimentos para demostrar que la capacidad del método satisface los requerimientos de la aplicación analítica deseada. La validación es un programa documentado que provee un alto grado de seguridad, de que un proceso específico producirá constantemente un resultado que cumpla con las especificaciones y atributos de calidad pre-determinados. las razones por las que se deben validar los métodos analíticos son: asegurar la calidad de los resultados, reducir los costos, cumplir con requisitos de autoridades gubernamentales (cuando estos sean establecidos), así como por razones éticas para evitar los reprocesos. Para esto, una parte integral del desarrollo de un método analítico es validado. Dichas pruebas consisten en evaluar las siguientes propiedades estadísticas de ejecución (Alcantara et al 1989; Pharma New, 1991; Rampazzo, 1990; WHO, 1989; Daniel, 1989), conforme los criterios de aceptación:

- Linealidad del Sistema.
- Linealidad del Método.
- Precisión.
  - a) Repetibilidad.
  - b) Reproducibilidad.
- Exactitud.
- Especificidad.

*Linealidad del Sistema.* Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad física, química o biológica con la cantidad del producto químico.

*Linealidad del Método.* Es la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad medible (cantidad del compuesto químico recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad del compuesto químico adicionado).



**Precisión.** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto a analizar. Usualmente se expresa en términos desviación estandar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método bajo condiciones normales de operación.

a) **Repetibilidad.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

b) **Reproducibilidad.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo laboratorio, utilizando el mismo equipo.

**Exactitud.** Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recuperación obtenido del analista de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de la sustancia empleada, para ello se requiere un estandar primario.

**Especificidad.** Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida unicamente de interés y no a otros componentes de la muestra.

# Objetivos

## 2 OBJETIVO GENERAL.

- Llevar a cabo un estudio "in vitro" de la toxicidad del Dodecilsulfonato de Sodio (DBSS) y Metil Paratión (MP) en *Moina macrocopa*, para monitorear los efectos de las descargas sobre sistemas acuáticos.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar el efecto tóxico de la concentración del DBSS y Metil Paratión sobre los niveles totales de Glutatión Reducido en *Moina macrocopa*.
- Evaluar el efecto tóxico de la concentración del DBSS y Metil Paratión sobre el grado de Lipoperoxidación en *Moina macrocopa*.
- Evaluar el efecto tóxico de la concentración del DBSS y Metil Paratión sobre la actividad de Lipasa en *Moina macrocopa*.

# Material y Métodos

### 3 MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1 Material biológico.

El cladócero *Moina macrocopa* se obtuvo del Lago de Texcoco; en el laboratorio fue identificado y seleccionado en un microscopio con ocular graduado, se lavaron las muestras con agua, para su cultivo se paso a un medio de agua dulce sintética, cuya composición química se muestra en el cuadro 7, colocando 20g de cladóceros/peso húmedo por 3 litros de agua sintética, se mantuvo iluminación natural, temperatura  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH 7-8.5, dureza total  $180 \pm 30$  mg/ml de  $\text{CaCO}_3$ . Oxígeno disuelto 6.5-7.5 mg/l. El agua fue cambiada en su totalidad cuatro veces por semana, removiendo los organismos muertos. El cladócero fue alimentado a base de alga *Ankistrodesmus falcatus*, que fue diluida con medio acuático reconstituido para *N. macrocopa*, hasta obtener una concentración de  $1.5 \times 10^6$  cel/ml, esta suspensión, por cada 100ml de agua sintética, sirvió para alimentar a 2.0g del cladóceros (peso húmedo) Después de 10 días, fueron seleccionados los cladóceros para trabajar.

Cuadro 7 COMPOSICION QUIMICA DEL AGUA DULCE SINTETICA PARA EL CULTIVO DE <i>M. macrocopa</i> .	
Reactivo	Concentracion (mg/l)
$\text{NaHCO}_3^*$	192.0
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$	120.0
$\text{MgSO}_4^*$	120.0
$\text{KCl}^*$	8.0

\* En agua destilada o desionizada. Tomada de Peltier y Weber (1985).

### 3.2 Determinación de Proteínas Totales en el Sobrenadante por el Método de Bradford.

La comparación de parámetros bioquímicos obtenidos de diferentes lotes de organismos fue mediante la normalización de los datos considerando la cantidad de proteínas.

#### 3.2.1 Reactivos:

1. Reactivo de Bradford: 100 mg de azul de Cumassie (Sigma), se disolvieron en 50 ml de etanol al 95%, adicionando 100 ml de Acido fosfórico Baker al 85%, aforando a un volumen total de un litro con agua desionizada.
2. Solución Stock de Albúmina: Se pesaron 100 mg de albúmina sérica bovina (Sigma) y se aforaron a 100ml con agua desionizada.

#### 3.2.2 Procedimiento:

La cuantificación de proteínas del sobrenadante se realizó de acuerdo al Método de (Bradford (1976)), se tomaron 25  $\mu$ l del sobrenadante, 75  $\mu$ l de agua desionizada y se le adicionaron 5.0ml del reactivo de Bradford, se agitó en vortex durante 60 segundos y 5 minutos después, se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotometro Varian DMS 90, el dato obtenido se extrapoló en la curva tipo de Albúmina sérica bovina y se determinó la concentración de proteínas por ml de sobrenadante.

#### 3.2.3 Curva de Calibracion:

Se preparó a partir de la Solución Stock de Albúmina (1mg/ml) siguiendo las cantidades mostradas en la cuadro 8.

**Cuadro 8**  
**Curva de Calibración para la Determinación de Proteínas**

Sol. de Albúmina μl	Agua desionizada μl	Reactivo de Bradford (ml)
10	90	5.0
25	75	5.0
50	50	5.0
75	25	5.0
100	0	5.0
Blanco 0	100	5.0

Dejar reposar 5 min. y leer a 595 nm.

### 3.3 Método Analítico de Adición de Estandar.

El método de adición de estandar consiste en agregar una cantidad conocida de analito en el fluido o tejido biológico que contiene una cantidad de GSH que es un compuesto endógeno. para ello en este caso se trabajo una serie de 7 tubos adicionando las siguientes concentraciones de GSH 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mM de GSH, esta técnica permite conocer la cantidad de GSH intrínseca que contiene la muestra.

#### 3.3.1 Preparación de soluciones.

##### 1. Solución de Tris buffer 0.2M.

Tris ((Hydroximetil) amino)etano) Sigma , solución amortiguadora de tris pH = 8.2. Se pesaron 12.11 gr. de Trizma base, se adicionaron 50ml de EDTA 0.02M y se aforó a 500 ml con agua desionizada, el pH fue ajustado con HCl 1N.

##### 2. Solución de EDTA 0.02M

Acido tetracético etilendiamino disódico hidratado (EDTA)  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$  Sigma . Se pesaron 7.4078 gr. de EDTA, se llevó a un volumen de 1000 ml de agua desionizada en un matraz volumétrico.

### 3. Solución de HCl 0.1N

Acido Clorhídrico (HCl). Se tomarón 8.16 ml de HCl Baker<sup>®</sup>, concentrado, se llevó a un volumen de 100 ml con agua desionizada en un matraz volumétrico.

### 4. Solución de DTNB 0.01M

5,5'-ditiobis-Cácido 2-nitro-benzoico) DTNB (Sigma)<sup>®</sup>. Se pesaron 0.1981gr, se llevó a un volumen de 50 ml de Metanol absoluto en un matraz volumétrico.

### 5. Glutati6n Reducido (GSH) Sigma<sup>®</sup>.

Para obtener las concentraciones deseadas se prepar6 una soluci6n stock de GSH de  $2 \times 10^{-3} M$ , se pesaron 0.0614 gr. de GSH y se llev6 a un volumen de 100 ml con EDTA 0.02M en un matraz volumétrico, de esta soluci6n se tomar6n 1, 2, 3, 4 y 5 ml. y fuer6n llevadas a un volumen de 10 ml con EDTA 0.02M, para obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10 mM/l

### 6. Metanol Absoluto Baker<sup>®</sup>

NOTA: Es importante que las soluciones sean preparadas el mismo día bajo una corriente de nitr6geno a excepci6n del EDTA y la soluci6n amortiguadora, estas dos últimas soluciones solo duran ocho días.

### 3.3.2 Determinaci6n de los Niveles de Glutati6n Reducido (GSH) en *Moina macrocopa*. (Sedlak J. 1968)

#### 3.3.2 Procedimiento.

Se pesaron 1 gr. de *Moina macrocopa* peso húmedo, se homogenizar6n con 5ml. de EDTA 0.02M, se centrifug6 a  $-5^{\circ}C$ , y 14000 rpm. durante 15 min. Despu6s de este tiempo se obtuvo el sobrenadante y se tomar6n alícuotas de 0.5 ml, a las cuales se les adicion6 1.0ml de buffer tris, 0.5 ml de DTNB, 0.5 ml de GSH en concentraciones 2,4,6,8 y 10 mM respectivamente y se llevar6n a un volumen de 10 ml con Metanol absoluto, se mezcl6, se centrifug6 a temperatura ambiente a 8000 rpm durante 15 min y se leyeron a 412nm



en un espectrofotometro Variam DMS-90. (Sediak et. al. 1966).

### 3.3.3 Determinación in vitro de los niveles totales de Glutación reducido (GSH) de *Molina macrocarpa* en presencia de DBSS y Metil paration.

#### 3.3.3 Procedimiento.

##### a). DBSS.

El Homogeneizado se preparó de la misma forma que se indica en el inciso 3.3.2 , después de obtener el sobrenadante se tomarón 7 alicuotas de 0.5 ml de homogeneizado y se adicionó 1.0 ml de buffer con un pH de 8.2 se mezcló y se incorporó 1.5 ml del toxon DBSS a diferentes concentraciones (0.25, 2.5, 25, 250 ppm). se mezcló en los tubos y fuerón incubados en baño a temperatura constante de 25° C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se le adicionó 0.5 ml de buffer, 0.5 ml de de GSH a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 mM se mezcló y se agregó 0.5 ml de DTNB y finalmente Metanol absoluto hasta obtener un volumen de 10 ml. se mezcló y se centrifugó 15min, a 8000 rpm y posteriormente se leyeron a 412 nm. en un espectrofotometro Variam DMS-90.

##### b) Metil Paratió. n.

Se siguió el mismo procedimiento que en el inciso anterior para DBSS, solo que las concentraciones de Metil Paratió. n. utilizadas fuerón (0.1, 1.0, 10, 100 ppm).

### 3.4 Determinación del Grado de Lipoperoxidación en *Molina macrocarpa*. (Hoving E. et. al. 1992 y Hiroshi 1979)

#### 3.4.1 Preparación de soluciones para la curva estandar.

##### 1. Solución Estandar de TEP.

1.1,3,3-tetrameloxipropano (TEP) (Malondialdehido bis (dimetil

acetato Sigma .

Para obtener las concentraciones deseadas se preparó una solución stock de 8.1 mmol/l. se tomó 0.89 ml de TEP y se aforó con KCl 0.15M a 500 ml en un matraz volumétrico. De esta solución se tomaron porciones de 1, 2, 3, 4 y 5 ml. y fueron ajustadas a 100ml con agua destilada, quedando las concentraciones finales de TEP de 0.081, 0.162, 0.243, 0.324 y 0.405 nM/l.

2. Solución de KCl 0.15M

Cloruro de Potasio (KCl) Merck. Se pesaron 5.6 gr. de KCl y se llevó a un volumen de 500 ml en un matraz aforado.

3. Mezcla A.

Contiene (Dodecil sulfato de sodio) Sal Sodica (SDS) 0.28M Sigma. se pesaron de este 2.025gr., además se agregó Glutación (GSH) Sigma 130mM del cual se pesaron 0.1019gr. y se llevarón a un volumen de 25ml en una solución de Cloruro de sodio (NaCl) Merck 0.15M.

4. Mezcla B.

Contienen Cloruro ferrico (Baker) 30.8 mmol/l del cual se pesaron 0.2081 gr. y se aforó a un volumen de 25ml en una solución de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 2.5M.

5. Acido 2-Thioarbiturico. (ATP) 0.0521M. Sigma<sup>1</sup>

Se pesaron 0.1841 gr. de ATP. se llevó a un un volumen de 25 ml con agua desionizada en un matraz volumétrico.

6. Hidroxido de Potasio (KOH) 10.7M. Baker<sup>1</sup>

Se pesaron 17.65 gr. de KOH, y se llevó a 25 ml con agua desionizada en un matraz volumétrico.

7. Butilato Hidroxitolueno (BHT) 136mM/l Sigma.

Se pesaron 0.7493 gr. de BHT, y se llevó a 25 ml con Metanol Absoluto en un matraz volumétrico.

8. Acetato de Etilo Baker<sup>1</sup>

### 9. Glutatión Reducido (GSH) 16.3mmol/l

Se pesaron 0.0255 gr. de GSH, y se aforaron a 5 ml con agua desionizada en un matraz volumétrico.

#### 3.4.2 Procedimiento.

Se pesaron 5 gr. de *Molina macrocarpa* peso húmedo se homogenizaron con 5 ml de KCl 0.15M, se centrifugó  $-5^{\circ}\text{C}$ , y 14000 rpm durante 15 minutos. Después de este tiempo se recolectó el sobrenadante, y se llevó a cabo la extracción de lípidos.

#### 3.4.3 Extracción de Lípidos.

A 250  $\mu\text{l}$  de homogeneizado, se le adicionó 10  $\mu\text{l}$  de solución de GSH en agua a una concentración de 16.3 mmol/l, 10  $\mu\text{l}$  de BHT en Metanol con concentración de 136 mmol/l y 5 ml de una mezcla de Hexano/Isopropanol (3:2 v/v) y la extracción se llevó a cabo por agitación mecánica durante 30 minutos, después se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y evaporado bajo corriente de nitrógeno en un baño a temperatura constante de  $35^{\circ}\text{C}$ . El extracto seco de lípidos fue inmediatamente usado para la reacción con TBA.

#### 3.4.4 Reacción con TBA.

Al extracto seco de lípidos, se adicionó 0.5 ml de la Mezcla A, 0.2 ml de BHT, 1.0 ml de solución de ATP, 0.4 ml de Mezcla B, se mezclaron y se incubaron en un baño de aceite a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, después se adicionaron 4 ml de Acetato de etilo frío, se agitaron en vortex durante 1 minuto, posteriormente se adicionaron 0.4 ml de KOH, se agitaron en vortex por 1 min., los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min. y la detección fue realizada en un espectrofotometro Varian DMS-90 a 537nm.

Para la curva estandar se adicionan 10  $\mu\text{l}$  de la diluciones de las soluciones standar de TEP de (0.081, 0.243, 0.324 y 405 nm/l) y se sigue el mismo procedimiento que en el párrafo anterior.

### 3.4.5 Determinación in vitro del Grado de Lipoperoxidación en *Moina macrocopa* en presencia de DBSS y Metil Paratió. n.

#### a) DBSS.

El homogeneizado se preparó como en el inciso 3.4.2. para la extracción de lípidos se tomarón 250  $\mu$ l de Homogeneizado, 125  $\mu$ l del toxon DBSS a diferentes concentraciones (0.25, 2.5, 25, 250 ppm), 10  $\mu$ l de solución de GSH y 10  $\mu$ l de BHT, se incubaron a temperatura constante durante 30 min. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo la extracción por agitación mecánica durante 30 minutos, después se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y evaporado bajo corriente de nitrógeno en un baño a temperatura constante de 35° C. El extracto seco de lípidos fue inmediatamente usado para la reacción con TBA. Al extracto seco de lípidos se adicionó 0.5ml de la Mezcla A, 0.2 ml de BHT, 1.0 ml de solución de ATP, 0.4ml de Mezcla B, se mezclaron y se incubaron en un baño de aceite a 95°C por 30 minutos, después se adicionaron 4 ml de Acetato de etilo frío se agitaron en vortex durante 1 minuto, posteriormente se adicionaron 0.4 ml de KOH, se agitaron en vortex por 1 min., los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min. y la detección fue realizada en un espectrofotómetro Variam DMS-90 a 537nm.

#### b) Metil Paratió. n.

El procedimiento para tratar las muestras con este xenobiótico fue el mismo que con DBSS solo que las concentraciones de Metil Paratió. n fueron (0.1, 1.0, 10, 100 ppm.)

### 3.5 Determinación de la Actividad de Lipasa en *Moina macrocopa*.

#### 3.5.1 Preparación de Soluciones.

##### 1. Buffer de Acetatos. 0.2M (Merck).

Se pesaron 2.73 gr. de Acetato de Sodio, se llevó a un volumen de

100 ml con agua desionizada en un matraz volumétrico.

2. Solución acuosa de rojo de fenol al 0.02% Sigma . (Indicador)

3. Hidroxido de Sodio (NaOH) 0.02N Baker.

Se disolvieron 0.1619 gr. de NaOH, y se aforaron a 200 ml con agua desionizada en un matraz volumétrico.

4. Preparación del Sustrato.

El sustrato se preparó mezclando 100 ml de buffer de acetatos, con 50 ml de Tween 20 (Polioxi-etilen sorbitan monolauril) (Sigma) 10 ml del indicador Rojo de fenol y 90 ml de agua desionizada, el pH de la mezcla se ajustó a 7.2.

### 3.5.2 Procedimiento.

5 gr. de *Moina macrocopa* peso húmedo, se homogeneizaron con 5ml de buffer de acetatos 0.2M, se centrifugó a  $-5^{\circ}\text{C}$ , y 14000 rpm durante 15min. se recolectó el sobrenadante y se tomaron alícuotas de 1 ml se adicionó 5 ml de sustrato, la mezcla se incubó en un baño a temperatura constante a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min., se agitaron en vortex y se titularon con NaOH 0.02N bajo una corriente de nitrógeno.

Por definición, 1ml. de NaOH 0.02N corresponde a 100 unidades de lipasa.

3.5.3 Determinación in vitro de la actividad de Lipasa en *Moina macrocopa* en presencia de DBSS y Metil paratió.

### 3.5.3 Procedimiento.

a) DBSS.

El homogeneizado se preparó de la misma forma que se citó anteriormente en el procedimiento, después de obtener el sobrenadante se tomaron alícuotas de 2 ml de homogeneizado y

se incorporó 1 ml del contaminante DBSS a diferentes concentraciones (0.25, 2.5, 25, 250 ppm.), posteriormente las mezclas se incubaron a 25°C en un baño a temperatura constante durante 30 min. de esta solución se tomó 1ml se le adicionó 5ml de sustrato, se incubó durante 10 min. a 20°C, después se agregó el indicador y la mezcla se tituló con NaOH 0.02N, bajo corriente de nitrógeno.

**b) Metil paration.**

El procedimiento para tratar las muestras con Metil Paration fue el mismo que con DBSS solo que las concentraciones fueron (0.1, 1.0, 10.0 y 100.0 ppm).

A todos los experimentos que se realizaron se les aplicó análisis de varianza y la prueba de Duncan para la diferencia de medias.

# Resultados

#### 4 RESULTADOS.

##### 4.1 Determinación de proteínas por el Método de Bradford.

El cuadro 9 y Fig 7 nos muestra los datos de absorbancia y la curva obtenidos por el método de Bradford para la cuantificación de proteínas.

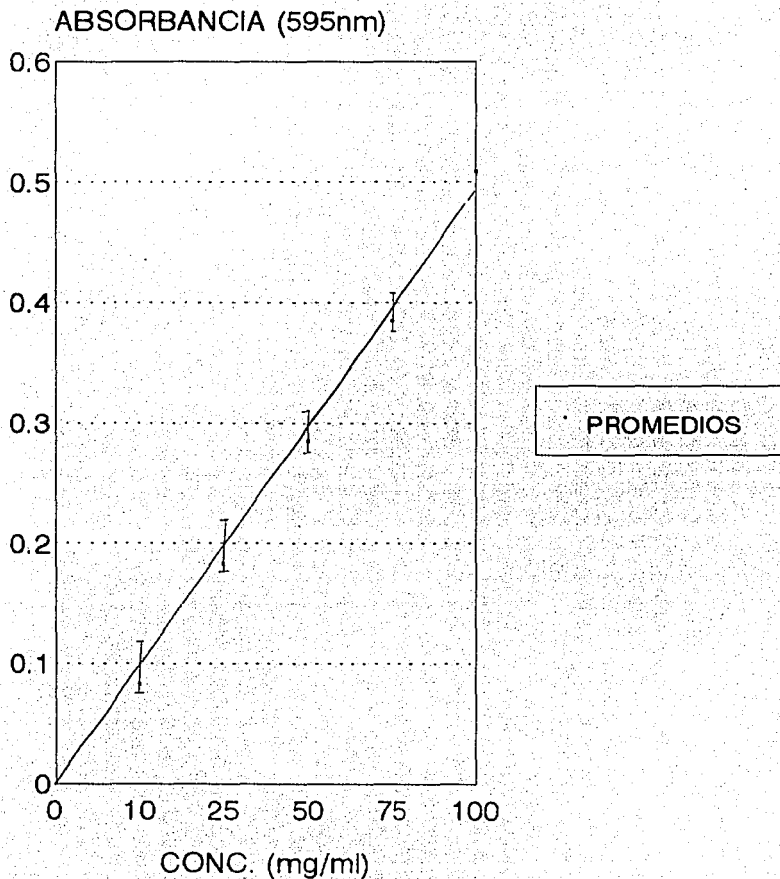
Cuadro 9  
Determinación de Proteínas por el Método de Bradford.

Concentración mg/ml	Absorbancia 595 nm
10	0.081 0.085 0.083
25	0.185 0.182 0.183
50	0.285 0.289 0.283
75	0.395 0.382 0.385
100	0.504 0.515 0.509



Fig.7 DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

Cada valor representa el promedio de 3 replicas.  $p < 0.05$   
± el Error Standar ES



#### 4.2 Efecto tóxico del DBSS sobre los niveles de Glutación GSH sobre *Moina macrocopa*.

Los resultados obtenidos Cuadro 10 y Fig. 8 para la determinación del efecto tóxico del DBSS sobre los niveles de Glutación Total en *Moina macrocopa*, muestra que no hay diferencia significativa en los valores encontrados de GSH total en las concentraciones de DBSS (0.25, 2.5, 25.0 ppm) con respecto al control ( $p < 0.05$ ) sin embargo a la concentración de 250 ppm existe una disminución de 41.88% de GSH total.

**Cuadro 10**  
Efecto del DBSS sobre los Niveles Totales de GSH sobre *Moina macrocopa*.

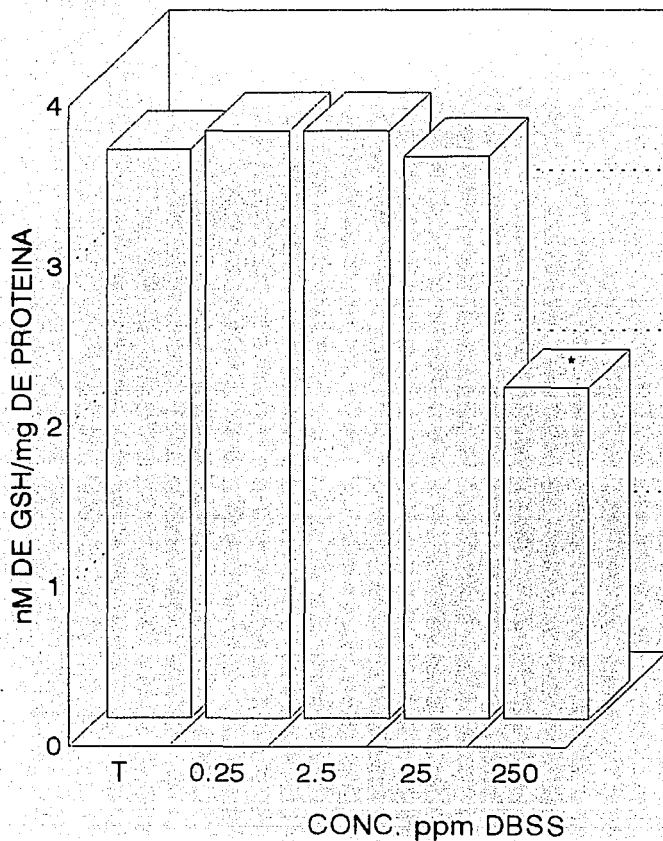
Concentración de DBSS ppm	nM de GSH / mg de proteína
Control	3.550 + 0.108 9
0.25	3.664 + 0.108 9
2.5	3.664 + 0.118 9
25	3.506 + 0.073 9
250	2.063 + 0.044 9

Se representa la media  $\pm$  Error Std.

\* Número de Datos.

Fig.8 EFECTO TOXICO DEL DBSS SOBRE LOS NIVELES DE GSH  
EN *Moina macrocopa*

Cada valor representa el promedio de 9 replicas.  $p < 0.05$   
± el Error Standar ES



#### 4.3 Efecto tóxico del Metil paratión sobre los niveles de Glutación GSH sobre *Moina macrocopa*.

Los resultados obtenidos Cuadro 11 y Fig. 9 para la determinación del efecto tóxico del MP sobre los niveles de Glutación total en *Moina macrocopa*, muestran que no hay diferencia significativa en los valores encontrados de GSH total en las concentraciones de DBSS (0.1, 1.0, 100.0 ppm) con respecto al control ( $p < 0.05$ ) pero se puede observar que a la concentración de 10 ppm existe un aumento del 5.41% de GSH total.

**Cuadro 11**  
Efecto del Metil Paratión sobre los Niveles totales de GSH sobre *Moina macrocopa*.

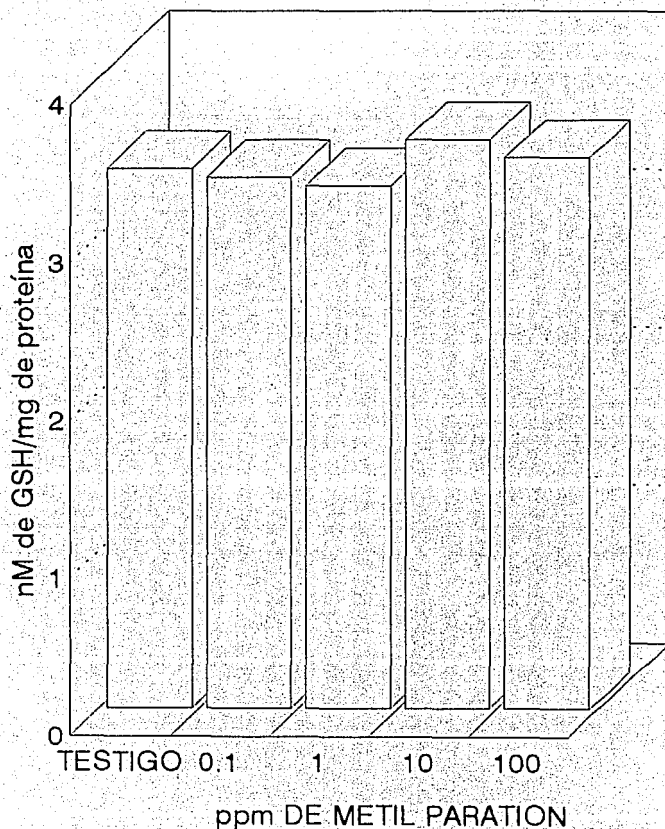
Concentración de MP ppm	nM de GSH / ng de proteína
Control	3.419 + 0.041 6
0.1	3.365 + 0.091 6
1.0	3.311 + 0.160 6
10	3.604 + 0.118 6
100	3.492 + 0.091 6

Se representa la media + Error Std.

\* Número de Datos.

Fig.9 EFECTO TOXICO DE MP SOBRE LOS NIVELES DE GSH  
EN *Moina macrocopa*

Cada valor representa el promedio de 9 replicas  $p < 0.05$   
± el Error Standar ES



4.4 Efecto tóxico del DBSS sobre el grado de Lipoperoxidación en *Moina macrocopa*.

Puede observarse en el cuadro 12 y fig. 10, que para todas las concentraciones de DBSS utilizadas en el estudio el grado de lipoperoxidación disminuyó con respecto al grupo control. Siendo el 28.29% de reducción para la concentración de 0.25ppm de 28.29%, para la concentración de 2.5ppm, 27.22%, a 25ppm 24.02% y a 250ppm 32.28%, ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 12**  
Efecto del DBSS sobre el grado de Lipoperoxidación en *Moina macrocopa*.

Concentración de DBSS ppm	nM de Malondialdehído por mg de proteína.
Control	0.562 + 0.059 12
0.25	0.403 + 0.031 12
2.5	0.409 + 0.045 12
25	0.427 + 0.041 12
250	0.380 + 0.039 12

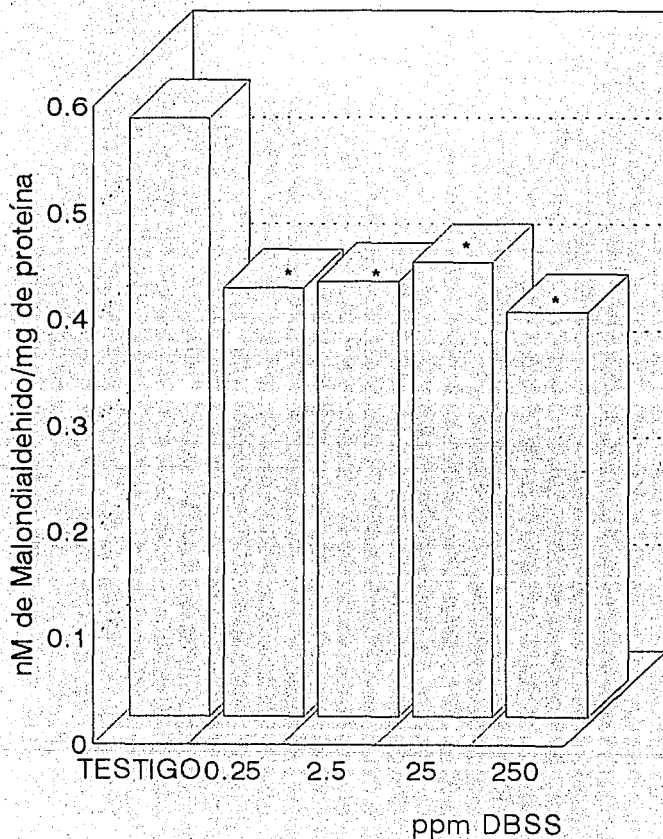
Se representa la media + Error Std.

\* Número de Datos.

Fig.10 EFECTO TOXICO DEL DBSS SOBRE EL GRADO DE LPO  
EN *Moina macrocopa*

Cada valor representa el promedio de 12 replicas  $p < 0.05$

± el Error Standar ES



4.5 Efecto tóxico del Metil Paratión sobre el grado de Lipoperoxidación en *Moina macrocopa*.

Puede observarse en el cuadro 13 y Fig. 11, que no hubo diferencia significativa entre la concentración de 0.1ppm de Metil paratión con respecto al control pero la tendencia sugiere un leve incremento ( $p < 0.05$ ). a las concentraciones de 1.0, 10.0 y 100 ppm se presentó una disminución de 37.32, 33.31 y 59.94% respectivamente considerando el control como 100%.

Cuadro 13  
Efecto del Metil Paratión sobre el grado de Lipoperoxidación sobre *Moina macrocopa*.

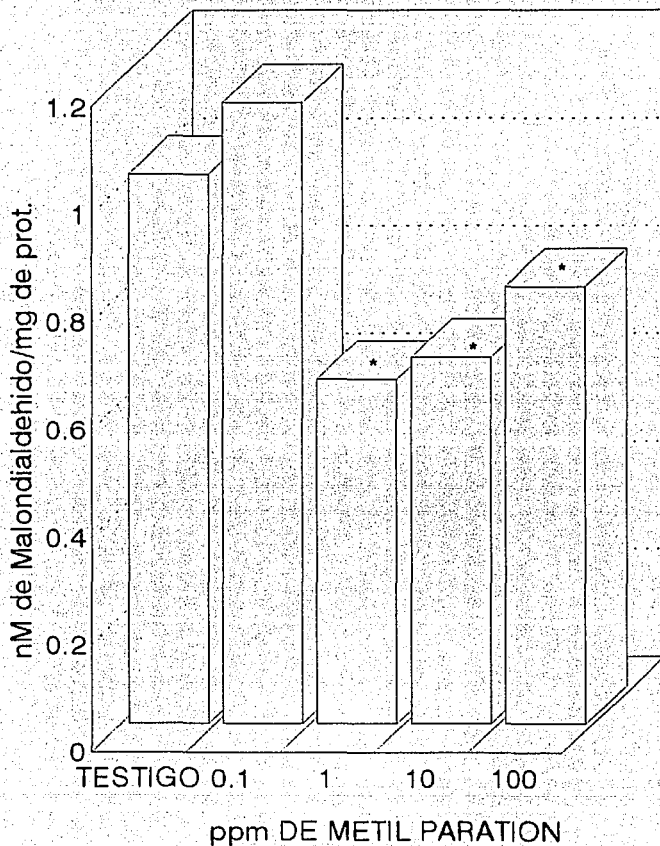
Concentración de MP ppm	nM de Malondialdehido por mg de proteína.
Control	1.021 + 0.058 12
0.1	1.154 + 0.053 12
1.0	0.640 + 0.038 12
10	0.681 + 0.062 12
100	0.812 + 0.032 12

Se representa la media + Error Std.  
\* Número de Datos.



Fig.11 EFECTO TOXICO METIL PARATION SOBRE EL GRADO DE LPO  
*EN Moina macrocopa*

Cada valor representa el promedio de 12 replicas  $p < 0.05$   
± el Error Standar ES



#### 4.6 Efecto tóxico del DBSS sobre la Lipasa en *Moina macrocopa*.

Los resultados obtenidos Cuadro 14 y Fig. 12, muestran disminución significativa de la actividad de la Lipasa a todas las concentraciones de DBSS usado siendo la reducción de la misma de 19.81, 31.53, 35.94 y 29.12 para 0.25, 2.5, 25 y 250ppm respectivamente. ( $p < 0.05$ )

**Cuadro 14**  
Efecto del DBSS en la Actividad de la Lipasa en *Moina macrocopa*.

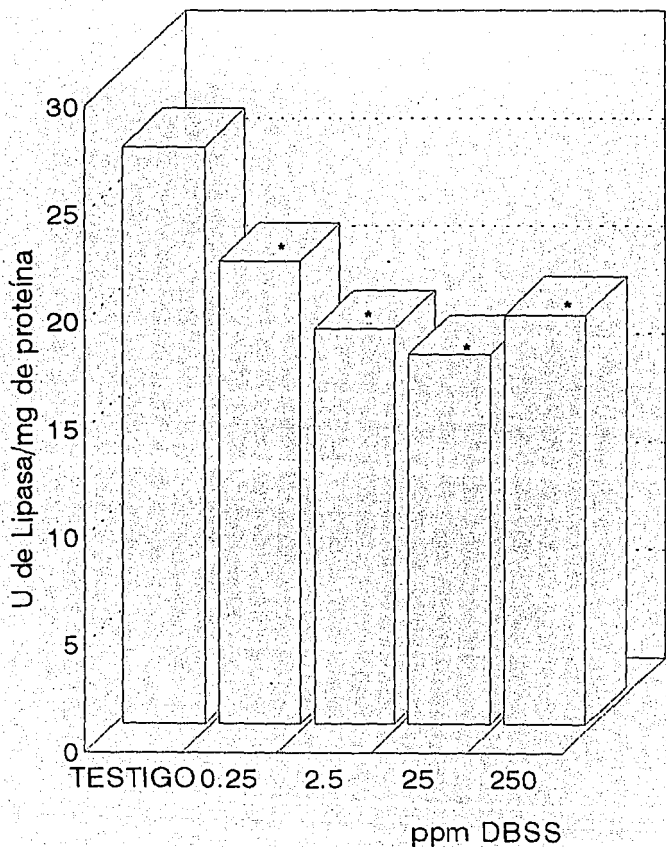
Concentración de DBSS ppm	U de Lipasa / mg de proteína.
Control	26.786 + 0.517 9
0.25	21.475 + 1.416 9
2.5	18.339 + 1.101 9
25	17.162 + 1.002 9
250	18.983 + 0.573 9

Se representa la media + Error Std.

\* Número de Datos.

**Fig.12 EFECTO TOXICO DEL DBSS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LIPASA  
EN *Moina macrocopa***

Cada valor representa el promedio de 9 replicas  $p < 0.05$   
± el Error Standar



#### 4.7 Efecto tóxico del Metil Paratión sobre la Lipasa en *Moina macrocopa*.

En los resultados obtenidos Cuadro 15 y Fig. 13 hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los valores encontrados de Lipasa pues disminuyen en la concentración 0.1ppm disminuye un 17.41%, con 1.0ppm 24.99%, 10ppm 58.56% y con 100ppm un 22.93% con respecto al control, notese que en la última concentración de 100ppm, existe una ligera recuperación.

Cuadro 15  
Efecto del Metil Paratión en la Actividad de la Lipasa en *Moina macrocopa*.

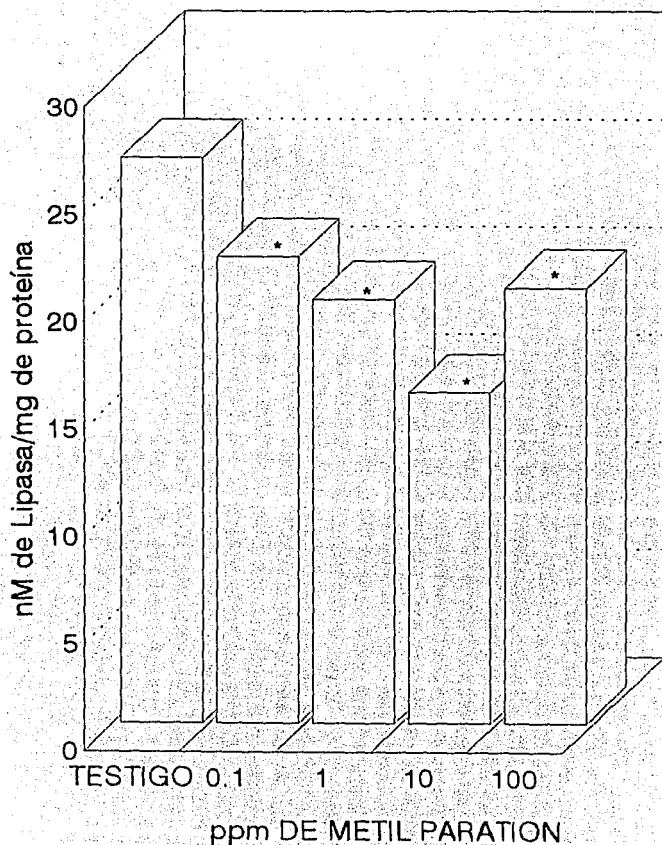
Concentración de MP ppm	U de Lipasa / mg de proteína.
Control	26.304 + 0.122 9
0.1	21.723 + 0.756 9
1.0	19.730 + 1.724 9
10	15.404 + 1.369 9
100	20.276 + 0.419 9

Se representa la media + Error Std.

\* Número de Datos.

Fig.13 EFECTO TOXICO DEL MP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LIPASA  
EN *Moina macrocopa*

Cada valor representa el promedio de 9 replicas  $p < 0.05$   
± el Error Standar



# Discusión

## 5 DISCUSION.

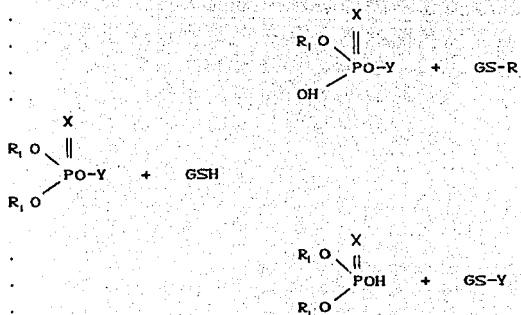
Los desechos industriales y domésticos que contienen entre otros contaminantes los insecticidas y detergentes, son vertidos a cuerpos de agua afectando a los hidrobiontes por la interacción de estos xenobióticos con los sistemas bioquímicos y fisiológicos de los organismos ocasionando intoxicaciones tanto subletales como letales.

El glutatión (GSH), es un tri péptido que se encuentra distribuido universalmente en animales, plantas y bacterias, el GSH juega un papel muy importante en los mecanismos de detoxificación ante cualquier xenobiótico, ya que forma conjugados menos tóxicos para el organismo y estos compuestos sintetizados son fácilmente eliminados (Anders M. W. 1992).

En este estudio se observó que los niveles totales de GSH del lote control del homogeneizado de *Moina macrocopa* no mostraron diferencia significativa con respecto a los obtenidos cuando se intoxicó con las concentraciones de DBSS de 0.25, 2.5, y 25ppm. Pero a la concentración de 250ppm, los niveles disminuyeron un 41.88%, probablemente el detergente este oxidando al GSH y también a la GSH reductasa de *M. macrocopa* lo cual permitira que la enzima aumente su actividad produciendo mas GSH para proteger a las membranas, presentandose así una compensación para mantener el funcionamiento normal del sistema antioxidante del cladóceros, esto concuerda con (Sussaman, 1977) quien sugiere que la acción inhibitoria de los detergentes esta sujeta a las condiciones del medio ambiente, en las que se incluyen la concentración, el tiempo de exposición, la temperatura, etc.

En este trabajo se demuestra que el efecto del Metil Paratión sobre los niveles de GSH no hubo diferencia significativa a las concentraciones de 0.1, 1.0 10 y 100ppm, estudios hechos por (Shishido y Fukami 1963), mencionan la existencia de una demetilación del Metil paratión en presencia del GSH, en un estudio realizado en la fracción del sobrenadante en homogeneizado de hígado de rata y algunas especies de insectos, es posible que

el Metil Paratión agregado al homogeneizado de *Molina macrocopa* capte tanto el GSH intrínseco como el endógeno, lo cual no permite la existencia de sustrato libre para el sistema enzimático donde interviene la glutatión reductasa y los niveles de GSH totales permanezcan sin alterar. A continuación se presenta la posible reacción entre el Metil Paratión y el GSH.



$\text{R}_1 = \text{Alquil}$        $\text{X} = \text{O o S}$        $\text{Y} = \text{Grupo funcional.}$   
**Reacciones de Organofosforados**

La lipoperoxidación consiste en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, de los lípidos constituyentes del tejido este mecanismo se lleva a cabo con la participación de los radicales libres que se encuentran implicados en una multitud de procesos patobiológicos, a causa de que estos grupos son muy reactivos y producen daños a nivel de membrana celular. (Valenzuela A. 1983). En este estudio se observó que a todas las concentraciones de dodecilsulfonato de sodio (DBSS) empleadas disminuyó el grado de Lipoperoxidación en el homogeneizado de *Molina macrocopa* expuesto a este xenobiótico. (Verna y col, 1979) Demostrarón que el DBSS inhibe la actividad enzimática de las ATPasas en branquias y cerebro de peces *Channapuntatus* que fueron expuestos a



este detergente, estos investigadores sugieren que el efecto se debe al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Así mismo (Vicenzi, 1982) sugiere que la causa de este efecto puede deberse a interacciones químicas de la carga negativa del detergente unida a las cadenas con diversas proteínas ocasionando así una acción inhibitoria de ciertas enzimas. En este estudio es probable que los aminoácidos del tipo cistina y cisteína de las proteínas que forman parte del homogeneizado de *M. macrocopa* expongan enlaces del tipo S-S y S-H ejerciendo un efecto protector al interactuar con los radicales libres que se están generando en el medio. (grupos reactivos que se producen inclusive endogenamente cuando un tejido es dañado a causa de que las células fagocíticas liberan peróxido de hidrógeno, compuesto que se sabe que produce la lipoperoxidación (Jeffrey A. 1993)). y de esta forma el detergente protege a las membranas del daño de peroxidación de ácidos grasos insaturados. (Sin embargo, para poder probar esta hipótesis se hace necesario plantear otro tipo de estudios.)

El Metil paratión es un insecticida organofosforado que se hidroliza en p-nitrofenol y ácido ortotiofosforico, este último compuesto se ha reportado (EPA 1987) tiene la capacidad de oxidarse facilmente en presencia de ácidos o de radicales libres para transformarse en el producto oxidado. En este estudio se observó que el Metil Paratión provocó una disminución del efecto de lipoperoxidación sobre todo a altas concentraciones de xenobiótico impidiendo la oxidación de los ácidos grasos de las membranas que forman parte del homogeneizado de *M. macrocopa* Esto se puede deber a que el Metil Paratión genere su producto oxidado en el medio y este capte los radicales libres que están disponibles para la peroxidación de la membrana. Este mecanismo que se propone se ha demostrado para otros xenobióticos como la Vit. C, Vit. E, Butilato hidroxianisol (BHA) y cisteína. (Numan I.T. 1990)

Las Lipasas son una clase de enzimas que hidrolizan triacilglicéridos y se encuentran distribuidas ampliamente en plantas, animales y microorganismos.

En este estudio se observó que el DBSS a todas las concentraciones empleadas disminuyó la actividad de esta enzima, este fenómeno probablemente se deba a que la Lipasa en medio acuoso expone su región hidrofóbica, la cual puede interactuar directamente con las del DBSS, resultando cambios en la estequiometría. (Kale 1978) informa que las glicoproteínas como es el caso de la Lipasa en soluciones acuosas presentan regiones hidrofóbicas, que interactúa en la interfase con detergentes aniónicos, lo que sugiere un cambio en la estructura terciaria.

Otra explicación podría ser que la pérdida de la actividad enzimática se debe a cambios conformacionales que permitan una agregación de la enzima esto esta de acuerdo con los informes presentados por (Stoclein W. 1993), que menciona que la actividad de la Lipasa disminuye en presencia de algunos detergentes como Lubrol PX, Triton X-100 y Triton X-114, presentandose una pérdida completa de la actividad cuando la enzima se diluía en buffer de fosfatos con detergentes.

Existen informes que diferentes organofosforados suprimen el metabolismo de los lípidos (Singh P.B. 1992). En este estudio se encontró que a todas las concentraciones de Metil Paratión se inhibió la actividad de la Lipasa. Es probable que el Metil Paratión este inhibiendo la actividad Lipogénica del homogeneizado del cladóceros y por lo tanto a la enzima, ya que existen informes de que este pesticida inhibe a la Acetilcolinesterasa y disminuye el contenido de proteínas. (Martinez T.L. 1994).

# Conclusiones

## 6 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos dar las siguientes conclusiones.

1. Se observó una disminución en el grado de Lipoperoxidación para las concentraciones de 1.0, 10 y 100ppm de Metil Paratión, a las concentraciones de 0.25, 2.5, 25 y 250ppm. de DBSS.
2. El efecto del DBSS sobre el sistema de GSH en el homogeneizado de *Moina macrocopa* no fue evidente a las concentración de 0.25, 2.5 y 250ppm.
3. El DBSS inhibe las enzimas lipolíticas de *Moina macrocopa*, inclusive a concentraciones que se consideran seguras.
4. El efecto inhibitorio de las enzimas lipolíticas por parte del DBSS y Metil paratión no es dependiente de la concentración de los toxones.
5. La Lipoperoxidación y la actividad de la lipasa son los parámetros bioquímicos mas sensibles en este estudio.

# **Apendice I**

## **Glosario**

## APENDICE I

### GLOSARIO

- **Antropogénicas.** - Son los cambios en el medio ambiente producidos por el hombre.
- **Biota.** - Conjunto de seres vivos de un región; combinación de flora y fauna.
- **Cadena Trófica.** - Es una secuencia coordinada de organismos en la que unos comen a los otros antes de ser comidos a su vez, donde los productores representan el punto inicial de la cadena. Por ejemplo los organismos más grandes emplean algas y bacterias como alimento, y a su vez se convierten en alimento de formas superiores de vida.
- **Contaminación.** - Es la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o cualquier combinación de ellos que perjudiquen o resulte nocivo a la vida, la salud y el bienestar humano, a la flora y fauna, o degraden la calidad del aire, del agua, del suelo o de los bienes y recursos en general (SEDUE, 1988).
- **Contaminante.** - Es toda materia o sustancia, sus combinaciones o compuestos, los derivados químicos o biológicos, así como toda forma de energía térmica, radiaciones, vibraciones o ruido, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, fauna o cualquier elemento ambiental, altere o modifiquen su composición, o afecten a la salud humana.
- **Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO).** - Es la cantidad de oxígeno requerida para la descomposición biológica de los sólidos orgánicos disueltos, en condiciones ananerobias y en un tiempo y a una temperatura determinada.
- **Demanda Química de Oxígeno (DQO).** - Esta prueba se basa en la digestión química de la muestra, con un agente oxidante como el dicromato de potasio. No se ha estandarizado ni adaptado extensamente ninguna prueba de determinación del DQO

- **Eutroficación.**- Enriquecimiento de agua dulce o salada por un elemento o compuesto químico. Los compuestos de nitrógeno y fosforo son agentes eutroficantes efectivos, ambos se hallan en elevados porcentajes en residuos de detergentes y de aguas de alcantarillado y de este modo las algas contaminantes obtienen sustancias nutritivas en las aguas residuales municipales.
- **Partenogenesis.**- Reproducción virginal o asexual por hembras no fecundadas.
- **Toxicidad.**- Grado de daño o respuesta de un tóxico a un organo vivo.
- **Tóxico.**- Sustancia que nos causa efecto nocivo que puede ser un Xenobiótico o un fármaco.
- **Xenobiótico.**- Cualquier sustancia ajena a un organismo vivo, y esta puede ser benigna, maligna o inocua.

# **Apendice II**

## **Validación**



## APENDICE II

### Desarrollo y Validación del método analítico para la determinación del grado de Lipoperoxidación.

#### Reactivos.

1.- Solución Estandar de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TEP) (Malondialdehído bis (dimetil acetal)).

Para obtener las concentraciones deseadas se preparó una solución stock de 8.1mmol/l. De esta solución se tomaron porciones de 1, 2, 3, 4 y 5 ml y fueron llevadas cada una a 100ml con agua destilada, quedando las concentraciones de TEP de 0.081, 0.162, 0.243, 0.324 y 405nM/l.

La Mezcla A, Mezcla B, Acido 2-tiobarbiturico, Hidroxido de potasio, Butilato hidroxitolueno y Glutación, se preparan de la misma manera que en la sección de determinación del grado de Lipoperoxidación.

#### Procedimiento.

Calibrado el equipo (espectrofotómetro Varian DMS-90), se procedió a reproducir el Método del Ac. Tiobarbiturico (Hoving, 1992). Se adicionaron 0.01ml de cada una de las diluciones de la solución estandar de TEP, se adicionó 0.5ml de Mezcla A, 0.2ml de BHT, 1.0ml de ATP, 0.4ml de Mezcla B y se incubaron en un baño de aceite a 95°C durante 30min. después se adicionaron 4ml de acetato de etilo frío, se agitaron en vortex por 1min, posteriormente se adicionó 0.4ml de KOH, se agitaron por 1min, los tubos fueron centrifugados a 5000rpm durante 10min. y la detección fue realizada a 537nm en un espectrofotómetro Varian. La realización de la curva fue realizada por triplicado durante 3 días: esto para determinar la Linealidad del Sistema.

#### Linealidad del Sistema para Lipoperoxidación.

En el cuadro 16 se muestran los resultados estadísticos del

análisis de varianza (ANDEVA).

En el cuadro 17 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de TEP estándar en solución acuosa. La figura 14 muestra una relación lineal simple entre la absorbancia y la concentración de TEP estándar en solución acuosa.

Cuadro 16 RESULTADOS ESTADISTICOS DEL ANALISIS DE VARIANZA (CANDEVA) PARA LA LINEALIDAD DE SISTEMA DE LIPOPEROXIDACION.				
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F exp.
Regresión	1	0.4553	0.4553	255.8
Error de regresión	43	0.0076	0.00017	
Falta de ajuste	3	0.0017	0.00057	3.906
Error puro	40	0.0059	0.00014	

Cuadro 17 VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS PARA CADA CONCENTRACION DE TEP ESTANDAR EN SOLUCION ACUOSA.	
Concentración en nM/l	Absorbancia
0.081	0.096
	0.076
	0.091
	0.089
	0.078
	0.083
	0.096
	0.093
	0.087

**Cuadro 17 (Continuación)**  
**VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS PARA CADA CONCENTRACION DE**  
**TEP ESTANDAR EN SOLUCION ACUOSA.**

Concentración en nM/l	Absorbancia
0.162	0.145 0.147 0.139 0.135 0.147 0.142 0.145 0.137 0.142
0.243	0.218 0.205 0.212 0.198 0.199 0.195 0.196 0.201 0.198
0.324	0.293 0.301 0.291 0.287 0.271 0.279 0.282 0.273 0.274
0.405	0.377 0.382 0.381 0.367 0.367 0.369 0.367 0.381 0.364

## Resultados.

a).  $r^2 = 0.9849$

b).  $r = 0.9924$

c).  $b = 3.8811 \times 10^{-3}$

d). La ordenada pasa por el origen  $H_0: B = 0$  se acepta dado que.

$$t_{exp} (0.3556) < t_{(n-2; 0.975; 44)} (2.0141)$$

e). Intervalo de confianza para la ordenada al origen (b)

$$-0.0181 < 0.0038 < 0.0258$$

f). Existe una relación altamente significativa entre la concentración de TEP en solución acuosa y la absorbancia.

$$F_{experimental} (255.8006) > F_{critica} (7.31)$$

g). La falta de ajuste a la relación lineal simple entre la cantidad adicionada - propiedad medida no es estadísticamente significativa

$$F_{falta\ de\ ajuste} (3.9068) < F_{critica} (4.08)$$

## Criterios de Aceptación.

a)  $r^2 > 0.96$

b)  $r > 0.99$

c)  $b = 0$

d) Prueba del intercepto nulo:

Hipotesis nula  $H_0: B = 0$

Hipotesis alterna  $H_0: B \neq 0$

Si  $t_{experimental} < t_{(n-2; 0.975)}$ , se acepta  $H_0$ , la ordenada pasa por el origen.

Si  $t_{experimental} > t_{(n-2; 0.975)}$ , no se acepta  $H_0$ , la ordenada no pasa por el origen.

e) El intercepto debe encontrarse dentro del intervalo de confianza para la ordenada al origen.

f) Existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{regresion} > F_{critica} (q1, q2, n, \alpha)$$

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresion}} < F_{\text{critica}}(g_l, g_l, 0.01)$$

g) La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida no debe ser estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} < F(g_l, g_l, 0.05)$$

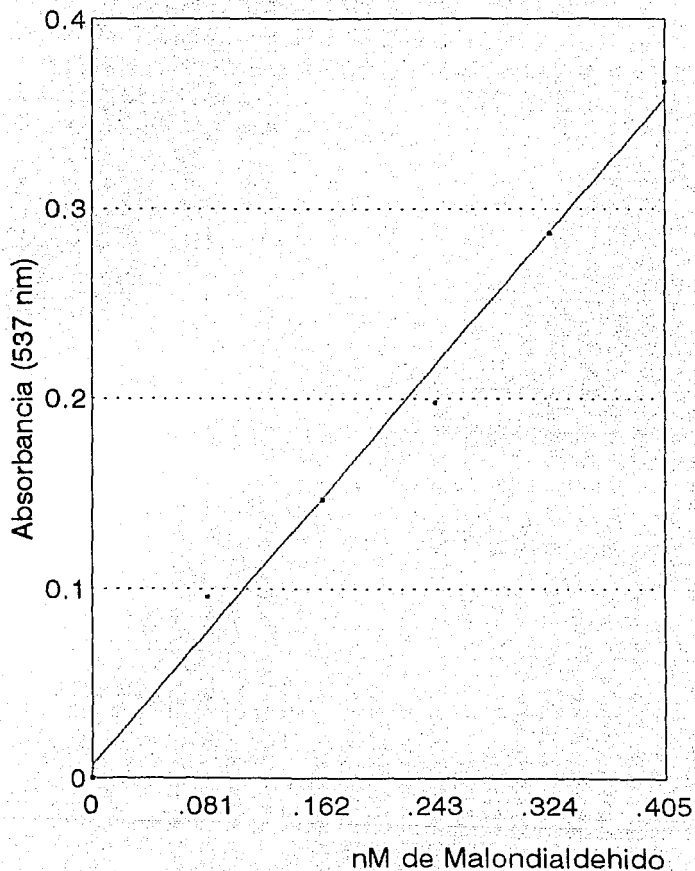
La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida es estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} > F(g_l, g_l, 0.05)$$

Fig.14 LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA LIPOPEROXIDACION

Cada valor representa el promedio de 9 replicas.  $p < 0.05$

$\pm$  el Error Standar



## Desarrollo y Validación del método analítico para la determinación de los niveles totales de Glutación (GSH)

Se calibró el espectrofotómetro Varian DMS-90, se procedió a reproducir el Método de (Ellmans Reagent 1967), para la determinación de grupos sulfidrilo (SH), utilizando el reactivo ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), se leyó en un espectrofotómetro a 412nm. Se realizaron dos curvas de calibración:

- a) La primera con el fin de determinar la linealidad del sistema acuoso, consistió en una serie de siete tubos a los que se adicionó 2.0ml de buffer, 0.5ml de DTNB y 0.5ml de GSH a las siguientes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10 mM), haciendo el análisis por triplicado.
- b) La segunda curva se realizó para determinar la linealidad del método, empleando 0.5ml de homogeneizado *Moina macrocopa*, agregando 1.5ml de buffer, 0.5ml de DTNB y 0.5ml de GSH a las siguientes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10 mM), haciendo el análisis por triplicado.

### Linealidad del Sistema para Glutación.

En el cuadro 18 se muestran los resultados estadísticos del análisis de varianza (ANDEVA).

En el cuadro 19 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de GSH estandar en solución acuosa. La figura 15 muestra una relación lineal simple obtenida para la absorbancia y la concentración de GSH estandar en solución acuosa.

**Cuadro 18**  
**RESULTADOS ESTADISTICOS DEL ANALISIS DE VARIANZA**  
**(CANADEVA) PARA LA LINEALIDAD DE SISTEMA DE GSH.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F exp.
Regresión	1	0.5219	0.5219	1368.2
Error de regresión	13	0.0049	0.00038	
Falta de ajuste	3	0.0016	0.00056	1.7406
Error puro	10	0.0032	0.00032	

**Cuadro 19**  
**VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS PARA CADA CONCENTRACION DE**  
**GSH ESTANDAR EN SOLUCION ACUOSA.**

Concentración en mM	Absorbancia
2.0	0.128
	0.128
	0.125
4.0	0.220
	0.216
	0.220
6.0	0.402
	0.401
	0.391
8.0	0.502
	0.513
	0.518
10.0	0.619
	0.616
	0.610



## Resultados.

- a).  $r^2 = 0.9919$   
b).  $r = 0.9959$   
c).  $b = 3.7073 \times 10^{-3}$   
d). La ordenada pasa por el origen  $H_0 B = 0$  se acepta dado que.

$$t_{exp} (0.3426) < t_{(10, 975, 13)} (2.1604)$$

- e). Intervalo de confianza para la ordenada al origen (b)  
 $-0.02707 < -0.0037 < 0.0196$

- f). Existe una relación altamente significativa entre la concentración de TEP en solución acuosa y la absorbancia

$$F_{experimental} (1368.158) > F_{critica} (9.07)$$

- g). La falta de ajuste a la relación lineal simple entre la cantidad adicionada - propiedad medida no es estadísticamente significativa.

$$F_{falta\ de\ ajuste} (1.7406) < F_{critica} (4.67)$$

## Criterios de Aceptación.

- a)  $r^2 > 0.98$   
b)  $r > 0.99$   
c)  $b = 0$

- d) Prueba del intercepto nulo:

Hipotesis nula  $H_0: B = 0$

Hipotesis alterna  $H_0: B \neq 0$

Si  $t_{experimental} < t_{(n-2; 0.975)}$ , se acepta  $H_0$ , la ordenada pasa por el origen.

Si  $t_{experimental} > t_{(n-2; 0.975)}$ , no se acepta  $H_0$ , la ordenada no pasa por el origen.

- e) El intercepto debe encontrarse dentro del intervalo de confianza para la ordenada al origen.

- f) Existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{regresion} > F_{critica} (glr, gler, 0.01)$$

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresion}} < F_{\text{crítica}} (g_l, g_l, 0.01)$$

g) La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida no debe ser estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} < F_{(g_l, g_l; 0.05)}$$

La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada-propiedad medida es estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} > F_{(g_l, g_l; 0.05)}$$

#### Linealidad del Método para Glutación.

En el cuadro 20 muestra los valores de la cantidad de GSH adicionada y recuperada en el sobrenadante de homogeneizado de *Motna macrocarpa*.

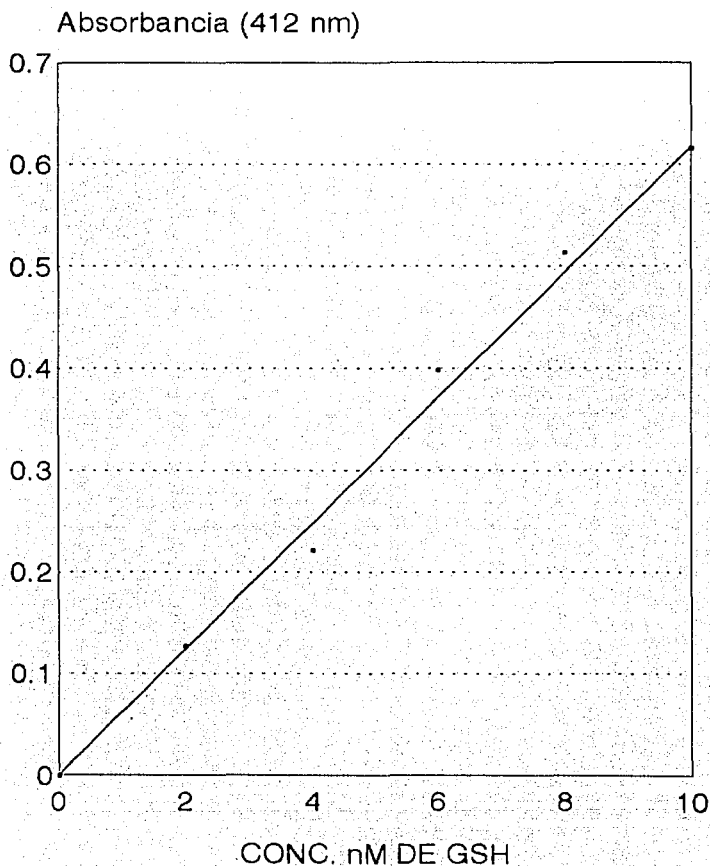
La figura 16 muestra una relación lineal simple entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de GSH.

El cuadro 21 muestra los resultados estadísticos del análisis de varianza (ANAEVA) para esta linealidad.

## Fig.15 LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA GLUTATION

Cada valor representa el promedio de 3 replicas.  $p < 0.05$

± el Error Standar ES



**Cuadro 20**  
**VALORES DE LA CANTIDAD ADICIONADA DE GSH Y CANTIDAD RECUPERADA DE GSH EN EL HOMOGENEIZADO DE MOINA MACROSCOPA.**

Cantidad adicionada en mM.	Cantidad recuperada en mM.
2.0	2.1299
	2.1153
	2.2029
4.0	4.1300
	4.0570
	4.2176
6.0	6.3199
	6.3199
	6.4805
8.0	7.6192
	7.7506
	7.6338
10.0	10.0865
	9.7799
	9.8967

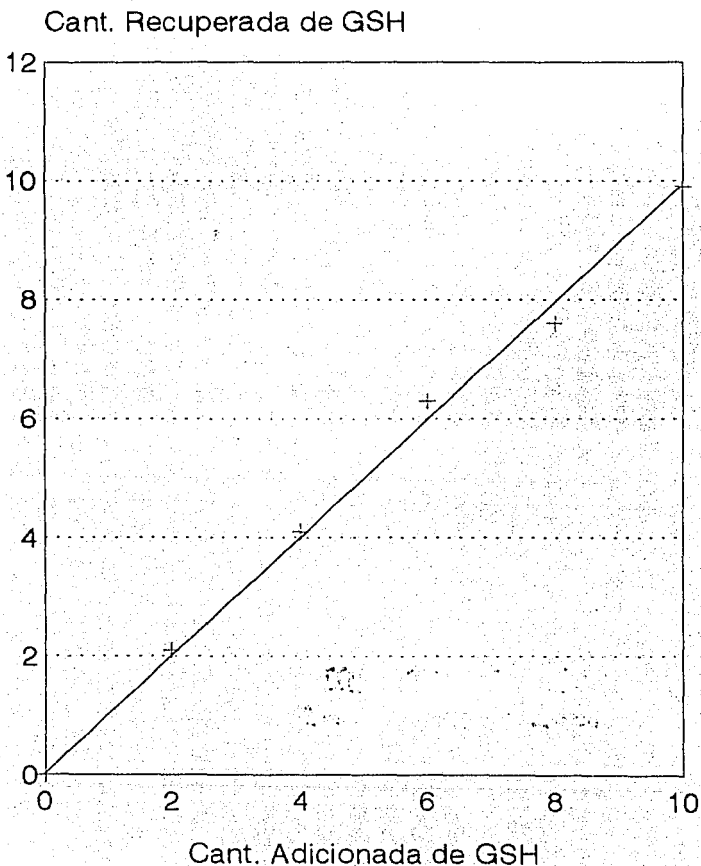
**Cuadro 21**  
**RESULTADOS ESTADISTICOS DEL ANALISIS DE VARIANZA (ANADVA) PARA LA LINEALIDAD DEL METODO.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F exp.
Regresión	1	68.1331	68.1331	1174.10
Error de regresión	13	0.7544	0.0581	
Falta de ajuste	3	0.17	0.0566	0.9696
Error puro	10	0.5844	0.058	

## Fig.16 LINEALIDAD DEL METODO PARA GLUTATION

Cada valor representa el promedio de 3 replicas.  $p < 0.05$

± el Error Standar ES



### Resultados.

a).  $r^2 = 0.9947$

b).  $r = 0.9973$

c).  $b = 0.2278$

d).  $m = 0.9667$

e). La ordenada pasa por el origen  $H_0 B = 0$  se acepta dado que.

$$t_{exp} (1.6456) < t_{(0.975, 13)} (2.1604)$$

f). Intervalo de confianza para la ordenada al origen (b)

$$-0.07147 < 0.2278 < 0.52707$$

g) la pendiente  $H_0 m = 1$  se acepta dado que:

$$t_{exp} (1.5137) < t_{(0.975, 13)} (2.1604)$$

h) Intervalo de confianza para la pendiente (m)

$$0.9191 < 0.9667 < 1.01423$$

i). Existe una relación altamente significativa entre la concentración de TEP en solución acuosa y la absorbancia

$$F_{experimental} (1174.101) > F_{critica} (9.07)$$

j). La falta de ajuste a la relación lineal simple entre la cantidad adicionada - propiedad medida no es estadísticamente significativa.

$$F_{falta de ajuste} (0.96965) < F_{critica} (4.67)$$

### Criterios de Aceptación.

a)  $r^2 > 0.98$

b)  $r > 0.99$

c)  $b = 0$

d)  $m = 1$

e) Prueba del intercepto nulo:

Hipotesis nula  $H_0: B = 0$

Hipotesis alterna  $H_0: B \neq 0$

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Si  $t_{\text{experimental}} < t_{(n-2; 0.975)}$  se acepta  $H_0$ , la ordenada pasa por el origen.

Si  $t_{\text{experimental}} > t_{(n-2; 0.975)}$  no se acepta  $H_0$ , la ordenada no pasa por el origen.

f) El intercepto debe encontrarse dentro del intervalo de confianza para la ordenada al origen.

g) Prueba de la pendiente

Hipotesis nula  $H_0: m = 1$

Hipotesis alterna  $H_0: m \neq 1$

Si  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tablas}}$  la hipotesis de nulidad no se rechaza.

el intercepto debe encontrarse dentro del intervalo de confianza para la pendiente.

h) Existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}} (g_l, g_l, 0.01)$$

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresión}} < F_{\text{crítica}} (g_l, g_l, 0.01)$$

i) La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida no debe ser estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} < F (g_l, g_l; 0.05)$$

La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada-propiedad medida es estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} > F (g_l, g_l; 0.05)$$

#### Precisión del Método para Glutación.

Se realizó el análisis por triplicado con dos analistas en dos diferentes días.

En el cuadro 22 se encuentran expresados los resultados de porcentaje de recobro para una solución estandar de GSH adicionada al sobrenadante del homogenizado de *Hoina macrocopa*.

realizado por 2 analistas en dos días. El cuadro 23 muestra un análisis de varianza (ANADEVA), para evaluar la precisión del método.

DIA	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	94.01%	99.12%
	99.35%	97.55%
	105.01%	105.82%
	96.07%	96.26%
	99.02%	100.71%
2	97.59%	100.14%
	98.07%	106.01%
	108.21%	102.24%
	95.49%	102.66%
	102.24%	99.99%

Fuente de variacion	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F exp.
Analista	1	19.4439	19.4439	1
Día	2	38.8878	19.4439	0.00032
Error	16	965448.40	60340.5256	

#### Resultados.

a). Coeficiente de variación (CV) = 3.74%

b). El método es preciso en:

Repetibilidad y Reproducibilidad entre analistas y días.

$$F_{\text{experimental}} (1) < F_{\text{critica}} (18.15)$$



$$F_{\text{experimental}} (0.00032) < F_{\text{crítica}} (3.63)$$

Criterios de aceptación.

a) C.V. < 10%

b) La reproducibilidad inter-analistas y la reproducibilidad inter-día/analista, debe satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método.

$$F_{\text{analistas}} < F_{\text{crítica}} (g_{1a}, g_{1d}; 0.05)$$

El método analítico es reproducible por los analistas.

$$F_{\text{analistas}} > F_{\text{crítica}} (g_{1a}, g_{1d}; 0.05)$$

El método analítico no es reproducible por los analistas.

$$F_{\text{días}} < F_{\text{crítica}} (g_{1d}, g_{1e}; 0.05)$$

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

$$F_{\text{días}} > F_{\text{crítica}} (g_{1d}, g_{1e}; 0.05)$$

El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

# Bibliografia

## 7 BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad S.I. and Ramana R.K. (1990). Correlation between subacute toxicity of Malathion and Acetilcholinesterase inhibition in the tissues of the teleost *Tilapia mossambica*. Bull Environ. Contam. Toxicol. 24:711-718.
2. Alcantara P.A. Material de apoyo al curso de Validación de Métodos analíticos. (1989) pp. 1-103
3. Ander M.W., Lash L.H., and Vamvakas S. (1992) Glutathione-dependent toxicity. Xenobiotica. 22:1135-1145
4. Ander M.W., Lash L.H., Dekant W., Elfarra A.A. and Dohn D.R. (1988) Biosynthesis and biotransformation of Glutathione's conjugates to toxic metabolites. CRT Crit. Rev. Toxicol. 18:311-341
5. Baker M.J. Biological Monitoring-Principles. Methods and difficulties in Marine Ecology and Oil Pollution. Applied Science Publisher. Great Britain. (1986), pp.41-53.
6. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye-binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
7. Bohiski R.C. Bioquímica. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana E.U.A. (1991), pp. 420-425. 628-638.
8. Capuzzo J.M. and Moore M.N. (1988). Effects of toxic chemicals in the marine environment: predictions of impacts from laboratory studies. Aquat. Toxicol., 11:303-311
9. Cassarett L.J., Doull J. Toxicology the Basic Science os Poison 4a. Edición. Mac. Millan Publishing Co. New York. (1989) pp. 565-569.
10. Chapman M.M. and Brinkhurst R.O. (1984). Lethal and Sublethal tolerances of aquatic Oligochaetes with reference to their use a biotic index of pollution. Hidrobiologia. 115:139-144.

11. Conklin D.E. and Provasolo L. (1978). Biphasic particulate media for the culture of filterfeeders. Biol. Bull. 154:47-54.
12. Comisión Nacional de la Ecología. Informe general de Ecología, Editado por SEDUE. (1986).
13. Cremlyn R. Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica Ed. Limusa. México D.F. (1986).
14. Daniel W.W. Bioestadística. Ed. Limusa. México D.F. (1989) pp. 285-288.
15. Denner J.W. Seiner and Herman J.L. (1988) Growth of the *Daphnia magna* exposed to mixtures of chemicals with diverse modes of action. Environ. Safety 15:72-77.
16. De Puaw., Laureys P. and Morales J. (1981). Mass cultivation of *Daphnia magna* straus on ricebran aqueculture. 25:141-152.
17. Diario Oficial de la Federación. Organó constitucional del gobierno de la Estados Unidos Mexicanos. Catálogo Oficial de Plaguicidas. (1991) 13:7-14.
18. Drehisbach. Manual de Toxicología Clínica 6a. edición. Ed. Manual Moderno. México D.F. (1988).
19. Environmental Protection Agency (EPA) (1987). Metil paratióñ efectos sobre la salud y el ambiente. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OMS. EPA. Metepec. México pp. 1-13.
20. Environmental Protection Agency (EPA) (1982). Produce by Departamente of Commerce National Technical information Service. Springfield UA. 221161.
21. Espigares M. Roman I., Gonzalez J.M. Yestle F. and Galvez R. (1990). Proposal and application of an ecotoxicity biotest on *Echerichia coli*. Journal of Applied Toxicology. Vol. 10(6):443-446.

22. Frumin G.T. Chuiko G.M., Pavlov D.F., and Mezylova O.V. (1992). New rapid method to evaluate the median effect. Concentrations of Xenobiotics in Hydrobionts. Bull Environ. Contam. Toxicol. 49: 361-367.
23. Goodman and Gillman. Bases farmacológicas de la terapéutica. 5a. edición. Ed. Interamericana (1978) pp. 100-119.
24. Gutierrez V.A. Aspectos Biológicos y algunas consideraciones sobre el cultivo en el laboratorio de *Moina macrocopa* CRUSTACEA: CLADOCERA. (Tesis Doctoral). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas: IPN, México D.F. (1990).
25. Halliwell B. and Gutteridge J. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transmittion metals and disease. Biochem J. 219:1-14
26. Hawkes W.J. The effects of petroleum hidrocarbon exposure on the structure of fish tissues in marine organisms and ecosystem. 1a. ed. Pergamon Press. New York. (1977) pp.115-137.
27. Hazzaru L. Virenda M. Viswanatha P.N. and Krishna C.R. (1983). Comparative estudios on ecotoxicology of synthetic detergents. Ecotoxicol and Environ Safety. 7:538-545.
28. Hinton D.E., Lantz R.C., Hampton J.A., McCuskey P.R. and McCuskey R.S. (1987). Normal versus abnormal structure: Consideration in morphologic responses of teleost to pollutants. Environmental Health Perspectives. Vol.71. pp. 139-146.
29. Hiroshi O., Nobuko O. and Kunio Y. (1979) Assay for Lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 95:351-358.
30. Hodgson E., Bend J.R., PhiPot R.M. Reviews in Biochemical Toxicology. Ed. Elsevier. North Holland. Inc. U.S.A. (1989) pp. 125-142.

31. Horning W.B. and Weber C.I.C.I. (1985). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati Ohio. EPA/600/4-85/014.
32. Horton A.A., Steven Fairhurst (1987). Lipid peroxides and mechanisms of toxicity. CRC Critical Reviews in Toxicology Vol. 18 Issue 1 pp. 27-62.
33. Hoving E., Laing C., Henk M. Rutgers., Teggeler M., Jaspe J. and Frits A.J. (1992) Optimization determination of malondialdehyde in plasma lipid extracts using 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid: influence of detection method and relations with lipids and fatty acids in plasma from healthy adults. Clinical Chemica Acta. 208: 63-76.
34. Ivleva I.V. Mass cultivation of invertebrates. Biology and methods. Academy of sciences of the URSS, all Union Hidrobiological Society and Israel Program for Scientific Translations. (1973) Cap. Daphnia pp.79-120.
35. Jeffrey A., Brend M.D., Barry H. and Rumack M.D. (1993). Role of free radicals in toxic hepatic injury. Clinical Toxicology 31(1):139-171
36. Lewis M.A. (1990) Chronic toxicities aspects of surfactans and detergent builders to algae: A review and Risk Assessment. Ecotoxicology Safety 20:123-140.
37. Little E.E., Archeski R.D., Flerov B.A. and Kozlovska V.I. (1990) Behavioral indicator of sublethal toxicity in rainbow trout. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 19:380-385.
38. Martin A.N. Fenomenos interfaciales en principios fisicoquímicos para farmacia y biología Ed. Alhambra S.A (1986) pp.559-690.

39. Martinez J.F. and Gutierrez V.A. (1991) Fecundity, reproduction, and growth of *Moina macrocopa* fed different algae. *Hydrobiology*. 22: 49-55
40. Martinez T.L., Alfaro Y.R., Sanchez H.E. and Galar C.I. (1991). Toxicity effect of Parathion on *Moina macrocopa* metabolism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 51-56.
41. Martinez T.L., Estrada M.B. and Galar C.I. (1991). Parathion and salinity effects on gill and mesonephros carbonic anhydrase activity of the fish *Oreochromis mororum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 929-934.
42. Martinez T.L., Santiago B.V. y Sanchez H.E. (1990). Efecto tóxico del Dodecibencensulfonato de sodio (DBSS) sobre branquias e hígado de peces tilapia *Oreochromis mororum*. *Acta mexicana de Ciencias y Tecnología Vol. VII. Num. 25* pp. 67-72.
43. Mason C.F. *Biología de la Contaminación del Agua dulce*. Editorial Alhambra S.A. Madrid, España. (1984)
44. Meister A. and Anderson M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-726.
45. Morrison T.R. and Boyd N.R. *Química Orgánica 2a. edición* Ed. Silesa, Mexico D.F. (1985) pp. 67-73.
46. Murray R., Mayes P., Granner D., Rodwell V. *Bioquímica de Harper*. Ed. Manual moderno, México D.F. (1988) pp. 25-27.
47. Murphy S.D. *Toxicology*. Mac. Millan Publishing Co. New York (1975) pp. 416-426.
48. Nikunen E. and Miettinen V. (1985). *Daphnia magna* an indicator of the acute toxicity of waste. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 334-366.

49. Numan T.T., Hassan M.Q. and Sthos S.J. (1990). Protective effects of antioxidants against Edrin-induced Lipid peroxidation Glutathione depletion, and lethality in Rats. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 302-306.
50. Payne F.J., Francey L.L., Rahimtula A. and Porter L.E. (1987). Review and perspectives on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. Comp. Biochem. Physiol. Vol. B6C No. 2 pp. 233-245.
51. Pharma News. 1a. parte Un acercamiento a la Validación de los Métodos Analíticos. (1991) pp. 16-21
52. Peltier W.H. and Weber C.I. (1985) Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organism EPA/600/748/485-0103. U.S.A. Cincinnati, Ohio.
53. Peters R.H. (1987) Daphnia Culture. Mem. Ist. Ital. Hidrobiol. 45: 483-495.
54. Prolux D. (1985). Harvesting *Daphnia magna* grown in the urban tertiary treated effluents water. Res. 10:1319-1324.
55. Sayer M. and Pucsko R. (1992). Trace element concentration of Oligochaetes and Relations to sediment characteristics in the reservoir at Altenworth/Australia. Hidrobiology. 226: 39-40.
56. Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL). Manual de bioensayos acuáticos y cultivo de organismos. Mexico D.F. (1992).
57. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE). Informe General de Ecología Control de la contaminación del agua, México D.F. (1988) pp.128-130
58. Sedlak Josef y Raymon H. (1968) Estimation of total Protein-bound, and non-protein sulphydryl group in tissue with Ellman Reagent. Analytical Biochemistry 25:192-205



59. Sheehan J.P., Miller G.C., Butler G. and Bourdeau Ph. (1984). Effects on individuals and Populations in effects of pollutants at the Ecosystem level. Publishe by John Wiley.
60. Shishido T. and Fukami J. (1963). Studies on the selective toxicities of organic phosphorus insecticides, II. The degradation of ethyl parathion, methyl parathion, methyl paraoxon and sumithion in mammal, insect and plant. Botyu-Kagaku. Biochem. 28:69-72.
61. Singh P.B. (1992) Impact of Malathione and g-BHC an lipid metabolism in the Freshwater Female Calfish, *Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicology and Enviromental. Safety 23:22-32.
62. Stocklein W., Sztajer H., Menge U. and Schmid R.D. (1993) Purification and properties of lipase from *Penicillium expansum*. Biochemica et Biofisica Acta. 1168:181-189.
63. Stocklein W., Sztajer H., Menge U. and Schmid R.D. (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Biochemica et Biofica Acta. 1214:43-53.
64. Sussaman M., Hays J.B. and Smith T.A. (1977). Selective reversible inhibition of the Lactose Phosphotransferase System of *Staphylococcus aureus* by Dodecylsulphate and Deoxycholate. Arch. Biophy. 182:134-137.
64. Valenzuela A., Fernandez V. and Videla L. (1983). Hepatic and biliary levels of Glutathione and Lipid Peroxides. Folling iron overload in the rat; effect of simultaneous ethanol administration. Toxicology and Applied Pharmacology 70:87-95.
65. Verna SR., Tyagi Ak., Pal N. and Dalels RC (1979). In vitro effects of the syntets idel 5L and swarcis 6L an ATPase activity in the teleost *Chaana punctatus*. Arch. Envirom. Contam. Toxicol. 8:241-246.

66. Vernberg J., Clabrerase A. and Frederick P. Biological monitoring of marine pollutants. Ed. Academic Press, New York. (1981)
67. Ville C.A. Zoologia. Ed. Interamericana 3a. Edicion México D.F. (1985) pp. 256-267.
68. Vicenzini MT (1982). Specific interaction among some enzymes and sodium dodecyl sulphate. Life Sciences 31:463-470.
69. Wilbert G.C. The biological aspects of water pollution publisher Springfield Illinois 2a. edicion. U.S.A. (1971)
70. Wong C.K. and Wong P.K. (1990). Life table evaluation of the effects of cadmium exposure on the freshwater cladoceran, *Moina macrocopa*. Bull Environ. Contam. Toxicol. 44:135-141.
71. World Health Organization (WHO) (1989) The validation of analytical procedures used in the examination of pharmaceutical materials. Organization Mondiales de la Sante. pp. 1-5
72. Yalcin A.S., Necla K.T., Mujdat U., Gulcin A., Anhet S. and Hikmet O. (1986). Stimulation of Lipid Peroxides and impairment of Glutathione-Dependent defence system in the liver of rats repeatedly treated with Carbon Tetrachloride. Journal of Toxicolgy Vol. 8(4):303-306.