

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO



FACULTAD DE QUIMICOFARCOBIOLOGIA
MAESTRÍA INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AREA TEMÁTICA:

BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA

**Valoración toxicológica aguda del sulfato de cobre y formaldehído en
nauplios de *Artemia franciscana***

TESIS

Que para obtener el título de :
Maestra en Ciencias Biológicas

PRESENTA: QFB. Rosa María Trujillo Aguirre

ASESOR: D.C. Ma. Del Carmen Bartolomé Camacho

CO-ASESOR: D.I. Raúl Cortés Martínez

MORELIA, MICHOACAN

JUNIO 2012



DEDICATORIA

*A las personas más importantes de mi vida, mis hijos
Alvaro y Rafel, mi esposo Alvaro.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita bondad hacia mí persona

A Alvaro López García por darme esta hermosa familia que me hace tan feliz. Varo y Rafa por ser el motor de mi vida y brindarme la fortaleza necesaria y no permitirme mirar atrás

A mi mamá Margarita Aguirre por que con su ejemplo me enseñó que hay que trabajar y luchar por lo que uno mas desea en la vida

A mi Papá Rafael Trujillo(qpd), por enseñarme a amar como el me amo, por confiar en mí sobre todas las cosas, y donde quiera que te encuentres sé estarás orgulloso de mí.

Agradezco a la Dra. Ma. Carmen Bartolomé Camacho y Dr. Raúl Cortés Martínez, por haberme abierto las puertas de su laboratorio para desarrollar este proyecto en el cual aprendí mucho durante todo este tiempo.

A la Dra. Ruth Alfaro, Marcia por compartir sus invaluable conocimientos con migo.

Un agradecimiento especial: A la Dra. Rebeca Rueda Jasso, por convertirse en una buena amiga que compartió no solo sus conocimientos en el área sino también parte de sus experiencias

profesionales y personales. Gracias por su paciencia y por esas charlas tan amenas.

A toda mi familia y amigos gracias por siempre estar presentes en mi vida.

Se agradece su apoyo económico a CONACyt y a la Coordinación de la Investigación Científica.

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de toxicología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	V
FIGURAS	VII
TABLAS	IX
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Contaminación del agua	4
2.2. Contaminación del agua de mar	6
2.3. Contaminación por metales pesados y compuesto orgánicos	7
2.4. Contaminación y toxicidad por cobre	10
2.5. Contaminación y toxicidad del formaldehido	11
2.6. Mezclas químicas de los biocidas	16
2.7. Bioindicadores en ecotoxicología	17
2.7.1. Relevancia de <i>Artemia</i>	18
2.7.2. Sistemática del ciclo de vida de <i>A. franciscana</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos particulares	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1. Agua marina sintética	26
6.2. Obtención nauplios de <i>Artemia</i>	26
6.3. Determinación de la toxicidad aguda	26
6.4. Determinación de la LC ₅₀ en mezclas de biocidas	27
6.4.1. Tipo de interacción	28
6.5. Estudios de toxicidad subaguda: Inhibición del fototactismo	28
6.6. Modelación de la especiación química	30
6.7. Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS	32
7.1. Toxicidad aguda del sulfato de cobre y formaldehido	32
7.2. Toxicidad de las mezclas de sulfato de cobre y formaldehido en Proporción 1:1.	33
7.3. Inhibición del fototactismo.	34
7.3.1. Inhibición fototactica de la mezcla formaldehido y sulfato de cobre	35
7.3.2. Combinaciones binarias formaldehido y sulfato de	36

cobre	
7.4. Especiación química.	39
8. DISCUSIÓN	44
8.1. Toxicidad aguda del sulfato de cobre y del formaldehído.	44
8.2. Toxicidad de mezclas químicas	45
8.3. Especiación química del cobre.	46
8.4. Especiación química del formaldehído	47
8.5. Inhibición del fototactismo	49
9 CONCLUSIONES	50
10 BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Vías de entrada de los metales hacia los organismos acuáticos	14
Figura 2 Morfología y ciclo de <i>Artemia</i>	27
Figura 3.- Fisiología del proceso de eclosión de <i>Artemia</i>	27
Figura 4 Esquema del diseño de la cámara oscura (A) y el elemento de cierre (B) empleados para la realización de los ensayos de inhibición del fototáctismo.	35
Figura 5 Toxicidad aguda del sulfato de cobre y formaldehído	38
Figura 6 Porcentaje de Inhibición fototáctica en nauplios I de <i>Artemia franciscana</i> de 24-h, por la exposición al sulfato de cobre y al formaldehído.	40
Figura 7 Porcentaje de Inhibición fototáctica de nauplios I de <i>Artemia franciscana</i> por la exposición de la mezcla de sulfato de cobre-formaldehído en proporción 1:1.	41
Figura 8 Inhibición del fototactismo en los nauplios I de <i>A. franciscana</i> del sulfato de cobre y del formaldehído de manera individual y sus combinaciones proporción 1:1.	42
Figura 9 Análisis de varianza del comportamiento fototáctico de <i>A. franciscana</i> en presencia de: A. sulfato de cobre y B formaldehído 37%	43

Figura 10 Análisis de la varianza de la mezcla de los compuestos en proporción 1:1.	44
Figura 11 Especiación del sulfato de cobre, se presentan las especies predominantes de cobre en la soluciones: blanco, cobre, formaldehído, mezclas 1:1.	46
Figura 12 Análisis de la varianza de la mezcla de los compuestos en proporción 1:1.	48
Figura 13 Especiación química de formaldehído; A) En solución de formaldehído y B) en mezcla 1:1.	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Especies acuáticas más sensibles al formaldehído en crustáceos y peces.	21
Tabla 2 Uso de <i>Artemia franciscana</i> como bioindicador	30
Tabla 3 Valores LC ₅₀ -24h, en mezclas binarias Cu-Formaldehído en proporción 1:1,	39
Tabla 4 Especiación química del cobre	47

RESUMEN

El formaldehído y sulfato de cobre son comúnmente utilizados en la industria, para limpieza de superficies como alguicidas en plantas de tratamiento de aguas y finalmente son vertidos a los cuerpos de agua. Los efectos combinados que estos productos tóxicos pueden tener, provocan un impacto negativo mayor que como componentes individuales. Los metales son altamente dependientes de los factores abióticos los cuales modifican las especies químicas presentes, el ion cúprico (Cu^{+2}) en cuerpos de agua a pH 7.4 es la especie tóxica disponible e incorporada a las cadenas alimentarias. En el presente trabajo se evaluó la (LC_{50}) del sulfato de cobre, formaldehído y su mezcla binaria (proporción 1:1) en nauplios I de *Artemia franciscana* de 24 h de edad; estos se expusieron en solución de agua marina sintética a concentraciones de 0.3, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4 mg/L sulfato de cobre y de 0.54, 0.71, 0.89, 1.11, 1.32, 1.5, 1.8, 2.02, 2.17, 2.84, 3.59, 4.44, 5.37, 6.39, 7.48 $\mu\text{L/L}$. de formaldehído. LC_{50} s resultantes para sulfato de cobre y formaldehído fueron 1.4 mg/L y 1.38 $\mu\text{L/L}$ respectivamente. Los resultados de toxicidad aguda ($\text{LC}_{50-24\text{h}}$) de la mezcla, de 1.16 mg/L para el cobre y 0.71 $\mu\text{L/L}$ para el formaldehído. Según la clasificación de toxicidad aguda propuesta por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), la LC_{50} de cobre corresponde a una sustancia moderadamente tóxica, y el formaldehído altamente toxica. El tipo de interacción en la mezcla es sinérgico de acuerdo a los modelos Proporción Sinérgica (PS) y Concentración Adición (CA).

ABSTRACT

Formaldehyde and copper sulphate are commonly used in the industry as surface cleaning agents and as algacides in water treatment plants, this means they are usually thrown into water bodies. Their potential and environment impact have been studied thoroughly. The combined effects that these toxic products have provoke a greater negative impact than those caused individually.

Polluting agents, such as metals, are highly dependent on abiotic factors (temperature, pH and salinity), which modify the chemical species that are present. The cupric ion (Cu^{2+}) found in water bodies at 7.4 pH is the most available toxic species. It is able to be added to food chains and unleashing bioconcentration, bioaccumulation and biomagnifications processes.

The objective of this study was to evaluate the water's acute toxicity (LC_{50}) of copper sulphate, formaldehyde and their binary mix (1:1 proportion) in "Artemia franciscana" "nauplii I" of 24 hours of age. The "nauplii I" were exposed to a synthetic sea water solution at formaldehyde concentrations of 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1 and 2.4 mg/L for a period of 24 hours. The resulting LC_{50} 's for copper sulphate and formaldehyde were 1.4 mg/L and 1.38 $\mu\text{L/L}$ respectively. Compared to the acute toxicity classification proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and the US Environmental Protection Agency (EPA), the copper sulphate's LC_{50} corresponds to a moderately toxic substance while the formaldehyde's corresponds to a highly toxic one. The acute toxicity results of the mix show $\text{LC}_{50-24\text{h}}$ values of 1.16 mg/L for copper sulphate and 0.71 $\mu\text{L/L}$ for formaldehyde. The mixture's type of interaction is synergistic according to the Synergic "Proportion (SP)" and "Concentration Addition (CA)" models.

I.- INTRODUCCIÓN

En nuestro planeta, las mayores reservas de agua se encuentran en los océanos, pues éstos cubren cerca del 72% de la superficie terrestre y almacenan el 97.3% del agua del planeta, de la cual 2.7% es dulce. Sin embargo, el agua continental representa menos del 1% del volumen total y la mayoría se encuentra en depósitos subterráneos (Mosqueira-Pérez 2009). Esta agua se ha visto alterada por actividades antropogénicas que han generado una gran variedad de contaminantes, los cuales han ocasionado el deterioro del ambiente, incluyendo tanto el agua como la biota asociada y por ende los ecosistemas. Estos efectos dependen de la concentración en la que se encuentren las sustancias, de su persistencia y biodisponibilidad, lo que ocasiona desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras (Romero y Cantú, 2008).

Los contaminantes más ubicuos son los metales pesados; algunos de estos se encuentran presentes formando parte de todos los seres vivos y son necesarios para el desarrollo y el crecimiento normal de los organismos. Los metales se consideran esenciales cuando tienen una función biológica conocida y se catalogan como no esenciales en caso contrario (Páez-Osuna, 1996a); ambos tipos de metales pueden resultar tóxicos a altas concentraciones (Connan y Stengel, 2011)

El cobre es un elemento traza que sólo representa el 7×10^{-5} % de la corteza terrestre. En animales adultos se encuentra en promedio de 1.0 mg (Kim *et al.*, 2008), mientras que las concentraciones naturales de cobre en agua de mar se estiman entre 0.5 a 3.0 $\mu\text{g/L}$ y en zonas contaminadas las concentraciones alcanzan 21 $\mu\text{g/L}$ (Dafforn *et al.*, 2011). No obstante, los estudios demuestran que a concentraciones de 10 mg/L se genera hemólisis en los peces y la consecuente mortalidad (Serezl *et al.*, 2011). Por otro lado, este elemento también afecta a los tejidos de los organismos al originar perturbaciones en una amplia variedad de sistemas enzimáticos a nivel de los

orgánulos intracelulares (mitocondrias, lisosomas) (Páez-Osuna, 1996; Kim *et al.*, 2008).

El peligro de los elementos metálicos potencialmente tóxicos depende de factores como su concentración en el medio, su combinación con otros compuestos orgánicos e inorgánicos presentes y de su ingreso a las cadenas alimentarias donde pueden ocurrir procesos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 1991).

Otro factor importante que influye en la toxicidad de los metales es la solubilidad en el agua de mar, la cual es controlada por varios factores como: pH, temperatura, salinidad y naturaleza de los aniones, entre otros (Ansari *et al.*, 2004). La solubilidad facilita la biodisponibilidad del cobre para los organismos marinos.

Por otro lado, los compuestos orgánicos como aldehídos, benceno e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son contaminantes tóxicos. El formaldehído es un constituyente traza que se encuentra ampliamente distribuido en la atmósfera y es un intermediario estable de la oxidación del metano y de otros contaminantes orgánicos volátiles (COVs). Mientras su concentración en el aire exterior es normalmente demasiado pequeña para ser importante (alrededor de 0.01×10^{-6} mg/L en áreas urbanas, excepto durante episodios de smog foto químico), en interiores presenta una concentración promedio de 0.1×10^{-6} mg/L (Colin-Baird, 2009). En la biosfera el formaldehído está involucrado en una gran variedad de procesos biológicos y químicos, el más importante es la oxidación fotoquímica del metano; asimismo es producto de fenómenos naturales tales como incendios forestales (OECD, 2002). Este compuesto está presente en bajos niveles en la mayoría de los organismos vivos y es emitido por las bacterias, algas, plancton y vegetación. En el agua se forma por la irradiación de sustancias húmicas con la luz solar (IPCS, 1989). Por otro lado las fuentes antropogénicas del formaldehído resultado de los procesos de combustión son la vía directa (plantas de energía, incineradoras, refinerías, estufas cigarrillos y calentadores de queroseno) e indirecta (oxidación fotoquímica de los hidrocarburos u otros precursores que son liberados en los procesos de combustión) (IPCS, 1989).

Debido al incremento en la contaminación tanto de metales pesados como de compuestos orgánicos, surge la necesidad de realizar análisis de las distintas especies químicas como herramienta para predecir su comportamiento dentro del ecosistema, tanto de manera individual como de sus posibles combinaciones. Esto puede ayudar a prevenir problemas de impacto ambiental dado que sus combinaciones pueden causar riesgos toxicológicos mayores (Ansari *et al.*, 2004).

El uso de organismos bioindicadores y bioensayos básicos para el estudio de la valoración del riesgo tóxico puede ayudar a entender la dinámica de los contaminantes y sus efectos en los ecosistemas. *Artemia franciscana* se comporta como un biosensor de contaminación acuática altamente eficaz en ambientes marinos (Persoone *et al.*, 1980 y Bartolomé y Sanchez-Fortún 2005; Zhou *et al.*, 2008; Pérez y Lazo, 2010). Adicionalmente, se trata de un organismo que presenta fácil manipulación, relativamente económico por lo que se ha convertido en un elemento fundamental para los estudios de toxicidad aguda y crónica (Bartolomé *et al.*, 2007; Pérez y Lazo, 2010).

El formaldehído y el sulfato de cobre son dos de los biocidas más ampliamente usados en industrias tales como plantas desalinizadoras, entre otras. La información sobre la toxicidad de las posibles combinaciones químicas de estos biocidas en organismos marinos es limitada. Por lo anterior, el presente estudio plantea evaluar la toxicidad del sulfato de cobre y del formaldehído de manera individual, así como sus combinaciones binarias en nauplios I de *Artemia franciscana*.

2.- ANTECEDENTES

2.1. Contaminación del agua

La contaminación es el resultado de la introducción de un contaminante en un ecosistema, es decir, la inserción de cualquier sustancia o forma de energía que pueda provocar algún desequilibrio definitivo o reversible en el ambiente inicial (García – Rodríguez, 2009). Independientemente de su origen los contaminantes finalmente se transportan a las fuentes de agua, las cuales por su abundancia en el planeta son los principales receptores. Los efectos de la contaminación afectan a humanos, animales, plantas y bienes y perturban negativamente sus actividades normales. De esta forma, no existe una división precisa entre las aguas contaminadas y no contaminadas. Por lo tanto, la contaminación del agua se define en función del uso, las exigencias higiénicas y del grado de avance de la ciencia y tecnología para determinar los efectos y medir los contaminantes. A pesar de la dificultad para medir la contaminación, es claro que esta provoca el abatimiento o muerte de la flora y la fauna, impide el uso del agua en la industria o en las ciudades y deteriora el ambiente e incluso el paisaje (Jiménez-Cisneros, 2005).

Aunque la contaminación ambiental química se inició con la revolución industrial (1830-1890) (Romero y Cantú, 2008), fue hasta después de la Segunda Guerra Mundial que el desarrollo tecnológico causó un aumento notable en el número de zonas industrializadas en el mundo, lo que conllevó a un aumento en el número de sustancias químicas de uso. Éstas a su vez causaron efectos adversos evidentes que motivaron la preocupación social que ahora existe sobre las consecuencias indeseables del desarrollo tecnológico (Albert, 2010). No obstante, la utilización de la gran mayoría de las sustancias químicas existentes y de las nuevas introducidas a los mercados se carece de estudios científicos previos que permitan conocer los posibles efectos tanto en el hombre como en el medio ambiente (PBS, 2001). Para 1983 se estimó que aproximadamente 6.3×10^4 compuestos eran de uso común a nivel mundial, de los cuales 3×10^3 representaban aproximadamente el 90% del total de los compuestos

producidos por la industria. Para 2007 se estimó una producción adicional de entre 200 a 1×10^3 nuevos compuestos por año (SEMARNAR, 2007).

En México se han utilizado unas 1×10^5 sustancias químicas en diversas actividades productivas. De éstas, se estima que entre 1×10^3 a 2×10^3 son peligrosas (SEMARNAT, 2007). Por otra parte, los listados de actividades de alto riesgo cuentan con un inventario de aproximadamente 4×10^2 sustancias químicas consideradas como tóxicas, inflamables y explosivas (Romero y Cantú, 2008).

Algunas de las sustancias químicas contaminantes más comunes y con mayor potencial tóxico son: a) Elementos como: antimonio, arsénico, cadmio, plomo, mercurio, selenio y b) Compuestos como: sulfitos, bifenilos policlorados, dioxinas e insecticidas (hidrocarburos clorados) (Bartolomé, 2005).

Dentro de los contaminantes más comunes destaca la utilización de biocidas, que incluye una amplia gama de sustancias capaces de eliminar o controlar la proliferación de microorganismos. El éxito de un biocida para una aplicación específica dependerá de la optimización de cinco parámetros en su actuación: a) coste, b) potencia, c) persistencia, d) velocidad y c) concentración. Otros aspectos a considerar son: el olor, corrosividad, inestabilidad química del formulado, toxicidad ambiental, biodegradabilidad y sensibilidad de los individuos. Todos estos factores determinan las características de un biocida en particular (Bartolomé *et al.*, 2005). Dentro de los biocidas la EPA ha establecido la siguiente clasificación:

I: Biocidas para la higiene humana.

II: Desinfectantes usados en ambientes de la vida privada y de la salud pública.

III: Biocidas para la higiene veterinaria.

IV: Desinfectantes para las superficies en contacto con alimentos

V: Desinfectantes para agua potable (Bartolomé y Sánchez-Fortún, 2007).

Estos biocidas son vertidos en las aguas continentales, costeras y oceánicas junto con cientos de millones de toneladas de productos de desecho de las industrias y de productos químicos utilizados en agricultura, además de las aguas residuales no

tratadas urbanas e industriales que contribuyen a la contaminación (Pavlaki *et al.*, 2010).

2.2. Contaminación del agua de mar

En el pasado, el desconocimiento del medio marino propició que se viera al océano como un depósito adecuado que por sus inmensas dimensiones y capacidad de autodepuración podría utilizarse como receptor ilimitado de todo tipo de contaminantes. No es de extrañar que la salud de nuestros mares hoy se vea mermada por un uso indiscriminado que no tuvo en cuenta limitaciones físicas y biológicas del medio (Gómez *et al.*, 2004; Mosqueira- Pérez, 2009).

Los contaminantes que llegan al medio marino son en algunos casos de origen orgánico y se desintegran por procesos biológicos normales, mientras que otros como los plaguicidas resisten la descomposición y subsisten largo tiempo en el ambiente ocasionando distintos efectos perjudiciales sobre la vida marina y la salud humana (Gómez *et al.*, 2004).

Diversas sustancias de difícil degradación creadas por la industria o elaboradas como subproductos de procesos industriales (producción de cemento, consumo de combustibles fósiles), lixiviación de metales desde los depósitos de desperdicio de desechos sólidos y basura en general e intemperismo geológico llegan al medio marino. Estos afectan y se acumulan en los organismos que forman parte de los ecosistemas acuáticos, pasando posteriormente a la cadena trófica y pudiendo llegar así hasta el hombre. Las sustancias radiactivas, los compuestos orgánicos persistentes (COP) y los metales pesados son las sustancias más representativas de estos procesos (Nadeem *et al.*, 2010). Por esta razón, para proteger a los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos, se han establecido normas y/o regulaciones ambientales basadas en concentraciones totales y disueltas máximas permitidas de los elementos químicos en forma individual, sin considerar el papel que juegan los factores ambientales (SEMARNAT, 2007). Por lo que esta aproximación no garantiza la protección de la vida silvestre.

Entre los contaminantes del agua más comunes se encuentran los metales pesados, los cuales varían en su nivel de toxicidad dependiendo de la solubilidad; la cual está controlada por varios factores como pH, temperatura, salinidad, alcalinidad, dureza, carbono orgánico disuelto, naturaleza de los aniones y cationes, entre otros. Lo anterior influye en la toxicidad de los iones metálicos ya sea directamente mediante la reducción de la concentración de los iones metálicos libres o indirectamente a través del sinergismo o antagonismo (Ansari *et al.*, 2004; Christiansen *et al.*, 2011).

2.3. Contaminación por metales pesados y compuestos orgánicos

Dentro de los elementos que en alguna de sus formas pueden representar un serio problema ambiental y es común referirse a ellos con el término genérico de "metales pesados"(Mathews y Van Holde, 1998) y compuestos orgánicos (Cotton y Wilson, 1988, Baas y Kooijman; 2010).

El término de metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una densidad mayor o igual a 6 g/cm^3 ya sea tóxico o venenoso en concentraciones bajas (otro criterio empleado es el número y el peso atómico). Además la toxicidad de los elementos depende en gran medida de las concentraciones que se traten. (Bautista-Zúñiga, 1999). Los metales se encuentran naturalmente en agua de mar. A bajas concentraciones se consideran esenciales para el correcto funcionamiento metabólico de los seres vivos (Por ejemplo, el cobre se es un micronutriente esencial en la biota marina). Sin embargo a concentraciones elevadas llegan a ser tóxicos cuando son absorbidos por las plantas o animales en las aguas costeras y sedimentos contaminados lo que representa una amenaza para la vida marina, (Sullivan y Krieger, 2001; Connan y Stengel, 2011); por ende son de los contaminantes más intensamente estudiados en el ambiente costero (Páez-Osuna *et al.*, 2005).

Los metales entran a los ambientes costeros y oceánicos a través de diversas rutas, principalmente por aporte fluvial, atmosférico y deposición. La transferencia de los metales hacia la zona costera y marina involucra la transferencia física de cada metal (ya sea disuelto o particulado), por medio del transporte de advección de agua.

La retención de los metales en la zona costera se presenta como resultado de una variedad de procesos físicos, químicos y biológicos (Páez-Osuna *et al.*, 2005).

La toxicidad de los metales derivados de los productos antropogénicos o acidificación de la superficie de los cuerpos de agua son un grave problema para los organismos acuáticos. Esto es debido a que los iones metálicos libres son las especies químicas mayormente tóxicas, en tanto que los complejos orgánicos e inorgánicos hacen al ion no disponible y por lo tanto menos tóxico. Este comportamiento está influenciado por parámetros químicos del agua (alcalinidad, dureza, carbono orgánico disuelto y pH, entre otros), los cuales influyen en la toxicidad de los iones metálicos ya sea directamente mediante la reducción de la concentración de los iones metálicos libres o indirectamente a través del sinergismo o antagonismo (Jackson *et al.*, 2000).

En los ecosistemas acuáticos los estudios de los metales están basados principalmente en la concentración total, sin embargo está comprobado que la biodisponibilidad (capacidad de un metal de atravesar la membrana celular) es altamente dependiente de la especiación química (Markich *et al.*, 2001) (Figura 1). Los organismos están expuestos a los metales a través de rutas o vías diferentes y dependiendo de la organización estructural y funcional del ecosistema la exposición al metal puede ocurrir mediante una fuente dominante (alimentos o agua) o una combinación de diferentes fuentes. Cuando los metales entran en un ambiente dado se distribuyen en diferentes fases dependiendo de sus características químicas específicas, naturaleza y disponibilidad de los sitios de unión. Por ejemplo, en el ambiente acuático, los metales se encuentran en solución o como partículas suspendidas o en sedimentos y son consumidos por diferentes tipos de organismos pasando a través de la cadena alimenticia. Dentro de cada una de estas fases los metales se presentan en diferentes formas o especies químicas. Un metal en solución forma pares de iones y complejos con los ligandos orgánicos e inorgánicos presentes, dando por resultado la formación de una multitud de especies químicas de metales (Adams *et al.*, 2010).

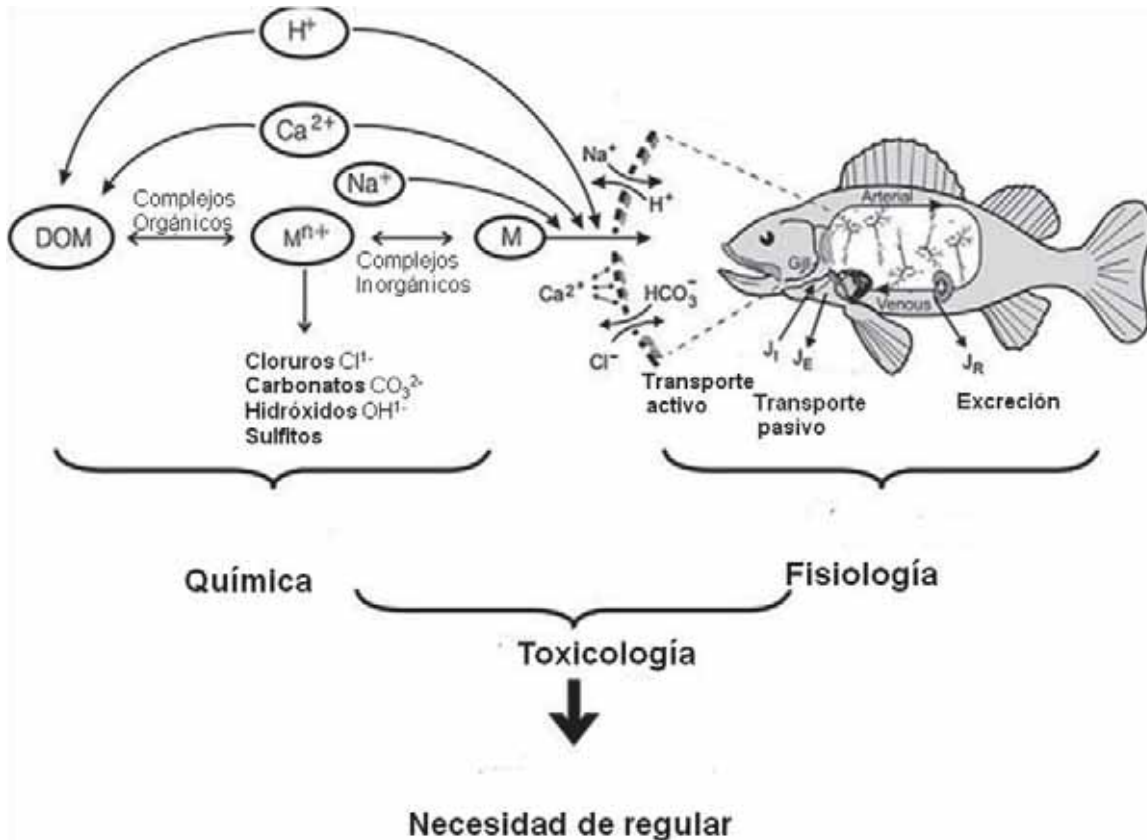


Figura 1. Vías de entrada de los metales hacia los organismos acuáticos (Adams *et al.*, 2010).

La comprensión detallada acerca de los metales pesados presentes en el medio requiere conocer la especiación química de los metales en solución, es decir las formas físico-químicas específicas que forman parte de la concentración total de un elemento en solución (Martínez *et al.*, 2006), particularmente la presencia de especies químicas que incluyen tanto elementos libres en forma neutra e ionizada y los variados complejos que pueden formarse con diferentes ligandos (Castañe *et al.*, 2003).

Por otro lado, el comportamiento de un metal depende de las especies químicas particulares que estén presentes. La mayor reactividad de una especie química no coincide necesariamente con la mayor concentración del metal en una determinada forma química. De ahí que el comportamiento de un elemento en el ambiente (biodisponibilidad, toxicidad, distribución, etc.) no pueda predecirse basándose tan sólo

en su concentración total (Martínez *et al.*, 2006). Los metales pesados pueden encontrarse en la fase acuosa en diferentes formas fisicoquímicas, como especies metal libre hidratado (M^{2+}) y complejos con ligandos inorgánicos o especies orgánicas formando quelatos con la materia orgánica complejante presente (Cobelo-García, 2003; Yim *et al.*, 2006; Christiansen *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2010).

2.4. Contaminación y toxicidad por cobre

El cobre es un elemento esencial para los procesos metabólicos en algas marinas, ya que es requerido en el transporte electrónico de la fotosíntesis (plastocianinas) y por varios sistemas enzimáticos (amino oxidasa y citocromo c oxidasa) (Rai *et al.*, 1981; Burkhead *et al.*, 2009). Asimismo es uno de los metales traza más tóxicos para las algas marinas después del mercurio (Gledhill *et al.*, 1997). El exceso de cobre inhibe la fotosíntesis (Küpper *et al.*, 2002), interrumpe el transporte de electrones en el foto sistema II (Nielsen *et al.*, 2003) e induce el estrés oxidativo (Contreras *et al.*, 2005 y 2009). La toxicidad del cobre es resultado de la inhibición competitiva de éste con los sistemas enzimáticos que requieren metales (Brand *et al.*, 1986). Sin embargo, ésta depende de la concentración de cobre disponible (Sorentino, 1979) y de la especiación (Gledhill *et al.*, 1997). El sulfato de cobre ($CuSO_4$) es uno de los compuestos más utilizados como alguicidas y herbicidas que se libera en los lagos y estuarios (Effler *et al.*, 1980; Carbonell y Tarazona, 1993) y en estanques en acuicultura (García *et al.*, 2010).

Investigaciones previas concluyeron que el uso del sulfato de cobre en el control de algas y parásitos de peces debe considerar la sensibilidad de las especies, así como el pH de los estanques de cultivo. Esto se basa en que tanto el cobre como el pH tienen mecanismos de toxicidad similares; ambos provocan excesiva producción de moco y su precipitación en las branquias, lo que puede llevar a la muerte por asfixia (Carvalho y Fernández, 2006). La toxicidad del cobre ha sido estudiada en muchas especies de peces y se ve influida no sólo por la concentración de este metal en el agua sino también por diversos factores tales como la alcalinidad, dureza y el pH, que influyen su

biodisponibilidad para los organismos acuáticos (Mazon y Fernández, 1999; Tao *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2000). De esta forma se ha referido que el cobre es menos tóxico para trucha arcoíris que habita en cuerpos de agua con elevada alcalinidad, debido a la formación de carbonato de cobre (CuCO_3) y la disminución de la concentración del ion libre Cu^{2+} (Jackson *et al.*, 2000).

El uso de productos con cobre en el medio acuático hasta la fecha es un serio problema para la química ambiental. No obstante, los efectos tóxicos de este compuesto han sido estudiados para entender la manera en que se puedan regular las condiciones y factores que alteran la toxicidad del cobre en los ecosistemas dulceacuícolas. Esta situación no sucede en los ecosistemas marinos (tropicales), que son los más susceptibles a la actividad humana y la degradación ambiental (Schwardenbach *et al.*, 2006).

2.5. Contaminación y toxicidad del formaldehído

Entre los compuestos orgánicos, los aldehídos (presentes en el aire contaminado) se forman como productos de la reacción fotooxidativa de los hidrocarburos. Los aldehídos de mayor interés son el formaldehído (HCHO) y la acroleína ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHCHO}$). Estos materiales contribuyen al olor y la irritación ocular de la niebla tóxica fotoquímica. El formaldehído representa aproximadamente 50% de los aldehídos totales estimados en el aire contaminado, en tanto la acroleína que es el más irritante de los dos, solo constituye 5% del aldehído total (Casarett y Doull's, 2008). Actualmente, el formaldehído es el agente cancerígeno emitido a la atmósfera más abundante. Varias organizaciones internacionales, federales y estatales han establecido normas o recomendaciones para el uso y producción de formaldehído.

El formaldehído también se conoce como metanal, óxido de metileno, oximetileno, metilaldehído, oxometano, formalina, aldehído fórmico. El formaldehído puro no es comercialmente utilizable, generalmente está disponible en concentraciones entre 37 a 54% en solución acuosa (IARC, 1995; IPCS, 2005). A temperatura y presión ambiente es un gas incoloro, de olor fuerte e irritante; a temperaturas menores a 20°C es un

líquido transparente e incoloro, soluble en agua (hasta 550 g/L a 25°C) (IPCS, 1989). La medida de coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) indica un bajo potencial de bioacumulación, lo cual se confirma en estudios con camarones y peces que no acumularon este compuesto (OECD, 2005; IPCS, 1989).

Asimismo, el formaldehído es un producto metabólico importante en plantas (descomposición de residuos de las plantas y la transformación de varios químicos emitidos por el follaje de árboles y arbustos) y animales; por ello está presente en el ambiente de forma natural en bajas concentraciones. Las fuentes de emisión del formaldehído en las que interviene el hombre están asociadas a la combustión incompleta de gasolinas en automotores sin convertidores catalíticos, como parte de los gases liberados a la atmósfera (IPCS, 1989; OECD, 2005).

El formaldehído es una sustancia de extensa aplicación industrial debido a la gran gama de productos y usos que se le puede dar; de acuerdo con Marking *et al.*, 1994 estos incluyen:

- ✚ la industria de cosméticos, como conservador en jabones, desodorantes, champús y en productos para la higiene oral;
- ✚ la industria azucarera, como inhibidor del crecimiento bacteriano en los jugos de la caña;
- ✚ En medicina se usa para la desinfección y esterilización de equipo médico y en preparaciones de conservación y fijación de tejidos;
- ✚ la industria del petróleo, como agente auxiliar en el proceso de refinado;
- ✚ la industria agrícola, para la conservación de granos, desinfección del suelo, protección de las raíces de plantas contra infecciones y como protección de proteína dietética en alimentos para rumiantes;
- ✚ la industria de los fertilizantes, en la fabricación de resinas diseñadas para la liberación lenta de fertilizantes en el suelo;
- ✚ la acuicultura y acuarofilia como agente desinfectante. **CITA**

Se estima que el uso del formaldehído como biocida es del 1.5% de la producción total (WHO IPCS, 1989).

En estudios realizados en camarones cuando se usó un tratamiento de 20×10^6 no se presentó acumulación de formaldehído, por lo que se considera un importante desinfectante para los animales destinados al consumo humano. Por ello, las granjas de camaronicultura administran formaldehído para controlar las enfermedades y para la profilaxis de los huevos y nauplios (Marking *et al.*, 1994). De igual forma se utiliza en la desinfección de alimentos vivos (*Artemia*) utilizados en la acuicultura (Hameed y Balasubramanian, 2000). Sin embargo, los tejidos del huésped también están expuestos a las mismas propiedades desnaturalizantes de las proteínas al igual que el patógeno, por lo que con el tiempo la difusión del formaldehído dentro de los tejidos podrán tener el mismo efecto letal (Jensen *et al.*, 2011). A bajas concentraciones el formaldehído es capaz de eliminar las bacterias en larvas de crustáceos sin llegar a ser tóxico (Homed y Balasubramanian, 2000; Digges, 2001), no obstante, en larvas de langosta de roca (*Jasus verreauxi*) a una concentración de 250 ppm tiene el potencial para causar una mortalidad muy significativa (Digges, 2001). En estudios estáticos realizados con formaldehído en *Daphnia magna* se obtuvo una LC_{50-24h} de 52 mg/L (Bringmann y Khun, 1977), aunque desde 33 mg/L comenzaron a aparecer desordenes fisiológicos en los organismos (Bringmann y Khun, 1982).

La investigación sobre los efectos del formaldehído en el ojo del pez globo (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) determinó una LC_{50} en 72 h de 79 mg/L, los efectos subletales se manifestaron como inmovilidad y lenta reacción a estímulos externos en un intervalo de concentración de 24 mg/L a 103 mg/L. En concentraciones superiores a 75 mg/L, después de 13 h de exposición los peces mostraron ojos vidriosos con una película opaca y después de las 20h hemorragias en los ojos (Fajer-Ávila *et al.*, 2004). En el caso de la trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) se presentaron efectos sobre la estructura del epitelio y la mucosa a concentraciones de 50 y 300 ppm (Buchmann *et al.*, 2004). En la tabla 2 se resumen algunas de las especies de invertebrados y peces más sensibles al formaldehído.

Tabla 1: Especies acuáticas más sensibles al formaldehído en crustáceos y peces.

Nombre científico	Nombre común	Prueba	Tiempo(h)	mg/L
Crustáceos:				
Cypridopsis sp.	Camarón semilla	EC ₅₀	0.96	3.6
Daphnia magna	Pulga de agua dulce	EC ₅₀	24	1.4 a 5
Notonecta spp (Linnaeus, 1758)		EC ₅₀	24	1800
Palaemonetes kadiakensis	Camarón común	EC ₅₀	2.88	860
Crangon crangon	Camarón	LC ₅₀	48	330 a 1000
Penaeus duorarum	Camarón rosa	LC ₅₀	96	235-270
Metapenaeus ensis (Haan 1844)	Camarón arena	LC ₅₀	24	633
Peces:				
Ameiurus melas (Rafinesque, 1820)	Bagre torito negro	LC ₅₀	24	69.2
Anguilla japonica (Temminck y Schlegel, 1846)	Anguila japonica	LC ₅₀	24	440
Anguilla rostrata (Lesueur, 1817)	Anguila americana	LC ₅₀	96	83.96
Ctenopharyngodon idella (Valenciennes, 1844)	Carpa china	LC ₅₀	0.48	448
Danio rerio (Hamilton, 1822)	Zebra	LC ₅₀	96	41
Micropterus salmoides (Lacepède, 1802)	Huro	LC ₅₀	6	412

Tabla 1. Continuación

Salmo salar (Linnaeus, 1758)	Salmon	LC ₅₀	2.88	564
Salmo trutta (Linnaeus, 1758)	Truita de mar	LC ₅₀	24	325
Salvelinus fontinalis (Mitchill, 1814)	Salvelino	LC ₅₀	6	241
Silurus glanis (Linnaeus, 1758)	Mal	LC ₅₀	0.48	1.13
Tanichthys albonubes (Lin, 1932)	Canton danio	LC ₅₀	48	2.1 – 2.4
Tilapia nilotica (Linnaeus, 1758)	Nile tilapia	LC ₅₀	96	148 – 179
Trachinotus carolinus (Linnaeus, 1766)	Pampano	LC ₅₀	96	69.1-74.
Chanos chanos (Forsskål, 1775)	Sábalo	LC ₅₀	96	232

Datos parcialmente tomados de Bartolomé, 2005.

2.6. Mezclas químicas de biocidas

Los ecosistemas acuáticos reciben una gran diversidad y cantidad de compuestos químicos provenientes de múltiples actividades humanas (agrícola, industrial, minera, entre otras) (Khangarot y Rathora, 2003; Banks *et al.*, 2005).

Una variable ambiental que afecta la toxicidad de los contaminantes químicos en los ecosistemas acuáticos es la presencia de las mezclas de contaminantes. En la estimación de criterios de calidad para la vida acuática, normalmente se consideran concentraciones de agentes químicos individuales que sean ecológicamente seguras. Sin embargo, las comunidades biológicas acuáticas usualmente están expuestas a varios contaminantes en forma simultánea, siendo la toxicidad de estas mezclas dependiente de las múltiples interacciones de sus constituyentes (McCarty y Borget, 2006).

Los efectos combinados de los múltiples productos químicos tóxicos son importantes dentro de la ecotoxicología, porque las mezclas de productos químicos originados pueden tener un impacto negativo mayor que los componentes individuales de la mezcla (Fernández-Alba *et al.*, 2002). La posible coexistencia de los productos químicos en el medio dulceacuícola y marino y la posibilidad de los efectos sinérgicos crea la necesidad de pruebas en productos de mezcla y complejos y obliga a no confiar sólo en los efectos de las sustancias químicas individuales (Karlsson y Eklund, 2004). Diversos estudios han demostrado que las mezclas de biocidas exhiben varios efectos: a) sinérgico, b) antagónico y c) aditivo, esto dependerá de la concentración de los biocidas y de las características fisicoquímicas del cuerpo de agua (Gaete y Paredes, 1996, Koutsaftis y Aoyama, 2007). Por ejemplo, el gluteraldehído, formaldehído, hipoclorito de sodio, metanol, etanol y sulfato de cobre son comúnmente usados como biocidas en plantas termales y desalinizadoras, como desinfectantes en aplicación médica y también como solventes en varias industrias. Estos compuestos desafortunadamente son descargados en ambientes acuáticos sin ninguna precaución; cuando se descargan se generan combinaciones de biocidas que ocasionan un efecto

sinérgico en su toxicidad afectando a los organismos acuáticos marinos que allí viven (Ahbu–Olayan y Thomas, 2006).

Dado que una sustancia química rara vez se encuentra sola en el ambiente (comúnmente esta combinada con otras sustancias) se han desarrollado estudios con mezclas binarias con el fin de predecir o evaluar de forma más clara el comportamiento de los contaminantes cuando son vertidos en el ambiente (Pavlaki *et al.*, 2010). Para predecir la toxicidad de los agentes químicos se han desarrollado modelos como el “Modelo del Ligando Biótico”; aunque esta herramienta predictiva no considera la interacción entre los agentes químicos en mezcla (Gaete y Chávez, 2008).

Los métodos para la evaluación de riesgo y peligro de mezclas químicas son utilizados en el desarrollo y análisis de nuevas sustancias químicas y particularmente en la regulación química. El enfoque más directo prueba las mezclas de interés en su totalidad, con el fin de proporcionar una estimación experimental de sus peligros y riesgos. Una aplicación importante incluye el estudio de las mezclas en efluentes de aguas residuales y los estudios de los productos químicos con el propósito de clasificarlos y etiquetarlos (KEMI, 2010).

Por lo anterior, se hace necesario contar con las herramientas para pronosticar la interacción entre agentes químicos, para ello se proponen los modelos propuestos por Fernández-Alba *et al.*, (2002), Koutsaftis y Aoyama, (2007), Gaete y Chávez (2008), Pavlaki *et al.*, (2010) que permiten observar y evaluar el efecto tóxico ocasionado por una serie de contaminantes. Estos modelos establecen dos conceptos de referencia basados en el modo de acción de cada contaminante a) Modelo de Concentración Adición (CA) y el b) Modelo de Proporción Sinérgica (PS); ambos permiten determinar el tipo de interacción que presenta la mezcla de compuestos.

2.7. Bioindicadores en ecotoxicología

Hoy en día se utilizan diferentes especies de organismos invertebrados en bioensayos para evaluar la toxicidad de agentes químicos. El desarrollo de estos se basa tanto en sus características biológicas como en el grado de sensibilidad que

presentan frente a los contaminantes. Los aspectos biológicos están principalmente relacionados con su mantenimiento en el laboratorio bajo condiciones controladas. El grado de sensibilidad hace referencia a las características de especificidad que han demostrado los diversos invertebrados frente a exposiciones con diferentes clases de compuestos químicos. Por otro lado, aseguran una correcta valoración e identificación del riesgo ambiental de los contaminantes químicos, la valoración del cociente concentración efecto, la valoración de la exposición y finalmente la caracterización del riesgo (Fan *et al.*, 1995).

Los indicadores biológicos (protozoarios, algas, invertebrados y peces) que se utilizan en los ensayos de toxicidad, ya sea especies individuales o comunidades completas, se aplican bajo la premisa de que son capaces de detectar y responder a los cambios de diversas variables ambientales (no sólo químicas), que resultan en la degradación de los recursos acuáticos. Estos indicadores son específicos para los diferentes tipos de ecosistema (dulceacuícolas, salobres y marinos), por lo que se deben hacer estudios detallados para definirlos y encontrar cuáles son las mejores especies indicadoras (SEMARNAT, 2007).

2.7.1. Relevancia de *la Artemia*.

Dentro de los organismos utilizados como biosensores se encuentra la *Artemia franciscana*. Este crustáceo de ambientes acuáticos de alta salinidad es un elemento fundamental en el conjunto del zooplancton, principalmente en ambientes estuarinos, y es un importante elemento de la cadena trófica. *Artemia* se comporta como un modelo biosensor de contaminación acuática de alta calidad y se utiliza ampliamente para los estudios de toxicidad (Persoone *et al.*, 1980).

Esto es debido a que se trata de un organismo de fácil manipulación que puede obtenerse como huevos encapsulados (quistes) para su posterior rehidratación en el laboratorio y así obtener poblaciones homogéneas de individuos capaces de ser utilizados en estudios de toxicidad (Pino-Pérez y Jorge-Lazo, 2010).

2.7.2. Sistemática y ciclo de vida *Artemia franciscana*

Phyllum	Artrópoda
Clase	Crustacea
Subclase	Branquiopoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	<i>Artemia</i> , Leach 1819

Los quistes secos de *A. franciscana*, miden aproximadamente de 0,2 a 0,3 mm de diámetro; estos se hidratan en agua de mar (sintética) y en un período de 24 a 36 horas eclosionan generando nauplios I. En este estadio su longitud es aproximadamente de 0.45 mm y dependiendo de las condiciones de alimentación crecerán llegando a su estado adulto con aproximadamente 12 mm de largo en un periodo de tres semanas. Los machos y las hembras son fácilmente distinguibles, la hembra produce descendencia después de la cópula con un macho (Lavens *et al.*, 1996) (Figura 2).

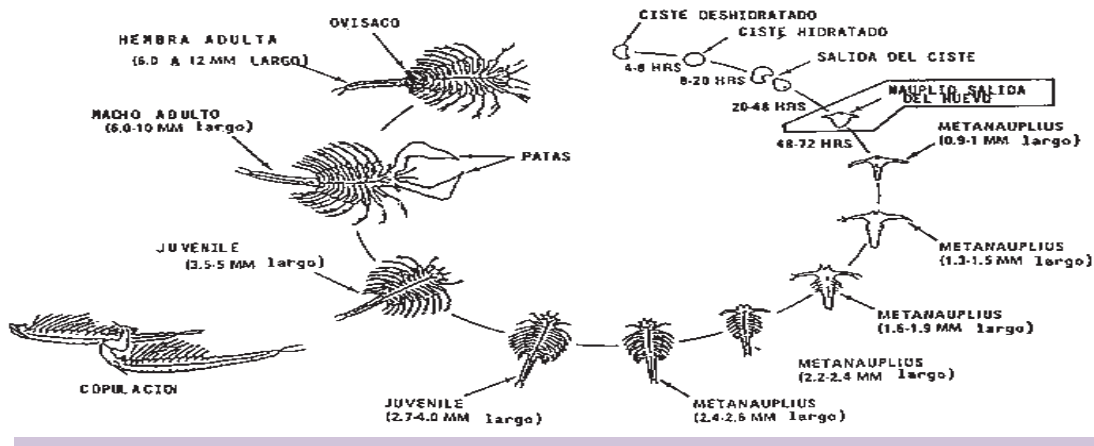


Figura 2. Morfología y ciclo de *Artemia*

Los quistes secos altamente higroscópicos absorben el agua rápidamente en las primeras horas el contenido de agua aumenta 40%. No obstante, el metabolismo activo comienza a partir de que la hidratación alcanza 60%, siempre que las condiciones ambientales sean favorables (Lavens y Sorgeloos, 1996).

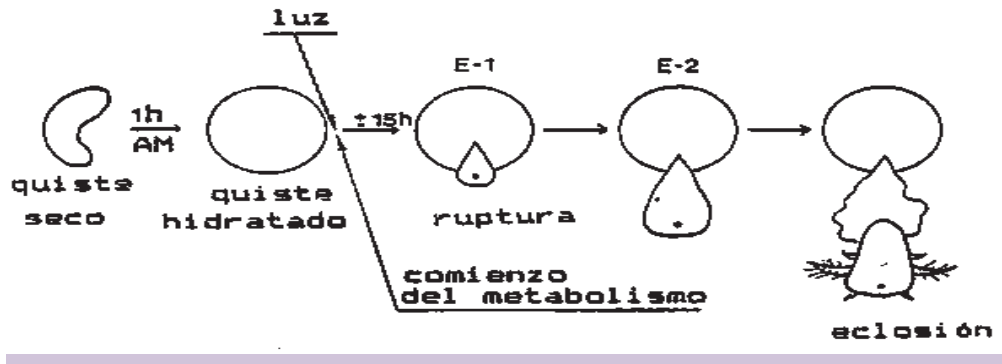


Figura.3. Fisiología del proceso de eclosión de *Artemia*

Una vez puestos en agua de mar, los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión reinicia su metabolismo. A las 20 horas de incubación la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión. Durante las horas siguientes, el embrión abandona completamente la cáscara del quiste. Posteriormente continúa la diferenciación del estadio pre-nauplios a nauplio I y sus apéndices comienzan a moverse; en un breve periodo de tiempo la membrana de eclosión se rasga emergiendo el nauplio que nada libremente (Lavens *et al.*, 1996). Tras aproximadamente 24 horas, el primer estado larvario (nauplio I) experimenta una muda alcanzando el segundo estado larvario (nauplio II). La larva continúa su crecimiento apareciendo diferenciaciones a lo largo de las 15 mudas hasta llegar a su estado adulto. *Artemia* se han empleado en diversos estudios toxicológicos, los cuales se resumen en la tabla 2.

En diversas especies de microinvertebrados incluyendo *Artemia* se han diseñado ensayos alternativos para determinar los factores que provocan estrés ambiental por contaminación antropogénica. Entre ellos está el seguimiento de los cambios en su

comportamiento fototáctic, el cual puede ser positivo (con movimientos hacia una fuente de luz) o negativo (con movimientos lejos de la fuente de luz). Esta conducta es el resultado de los efectos integrados sobre el sistema nervioso y muscular que son visibles y fácil de cuantificar (Martins *et al.*, 2007). Trabajos como los publicados por Kannupandi *et al.*, 2001 en el cagrejo de mangle (*Macrophthalmus erato* De Man), reflejan la idoneidad de la aplicación de esta prueba.

Tabla 2. Uso de *Artemia franciscana* como bioindicador

Tipo de estudio	Referencia
Utilizaron <i>A. salina</i> para evaluar la respuesta de las partículas de alta energía (HZE por sus siglas en inglés) de radiación cósmica durante el vuelo espacial del Apolo 16 y 17. Se observó la muerte de los organismos en los diferentes estadios de desarrollo y malformaciones en abdomen y extremidades de los nauplios .	Ruther <i>et al.</i> , 1974; Bucker y Horneck, 1975; Graul <i>et al.</i> , 1975.
Se evaluaron los efectos del espectro de la radiación sobre la toxicidad fotoinducida de tres hidrocarburos aromáticos.	Diamond <i>et al.</i> , 2000.
Se evaluó la toxicidad y bioacumulación de compuestos organotino. Se uso <i>Artemia</i> para determinar la calidad de agua en el Golfo Thermaikos, Mar Egeo y en Magnesia, Grecia.	Kungolos <i>et al.</i> , 2001. Kungolos <i>et al.</i> , 2003; Podimata, <i>et al.</i> , 2004.
Se probó toxicidad de extractos algales solubles en agua como aldehídos 2E,4 E-decadienal, decanal, undecanal y el ácido graso eicosapentanoico, sobre el éxito reproductivo y el crecimiento larval de <i>Artemia salina</i> .	Caldwell <i>et al.</i> 2003.
Se investigó la respuesta letal a metales como níquel y zinc. Se realizaron bioensayos con <i>A. franciscana</i> para probar la actividad de insecticidas como compuestos de cianohidrinas y monoterpenoides.	Jiménez <i>et al.</i> 2006.
Se valoró la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes domésticos y salud pública sobre <i>Artemia franciscana</i> .	Bartolomé y Sánchez-Fortún 2007.
Se probó <i>A. franciscana</i> para evaluar fungicidas	Peterson, <i>et al.</i> , 2000 y Guida, <i>et al.</i> , 2008.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los mayores inconvenientes del uso de biocidas es su impacto ecológico potencial cuando estos compuestos son vertidos al medio acuático. En muchos casos, el efecto agudo sobre distintas especies acuáticas puede ser el resultado de descargas de altas concentraciones de biocida y sus combinaciones en el medio. El principal problema por los vertidos de biocidas al medio acuático, es el riesgo que supone estas descargas sobre la flora y fauna acuática, el cual debe ser especialmente considerado. En muchas ocasiones cuando se descargan mezclas de biocidas en los mares se ocasiona un efecto combinado de los múltiples productos químicos tóxicos, lo que se considera un problema importante dentro de la ecotoxicología, ya que estas mezclas pueden tener un impacto negativo mayor que los componentes individuales de la solución. La posibilidad de los efectos sinérgicos crea la necesidad de realizar pruebas de la mezcla de productos y obliga a no confiar sólo en los efectos de las sustancias químicas individuales

Para preservar los ecosistemas acuáticos de daños y efectos adversos derivados se emplean ensayos toxicológicos. Los modelos para los estudios de toxicidad (bioensayos tradicionales en ratón) de una muestra sospechosa se han sustituido métodos *in vitro* que han demostrado ser eficaces. El empleo de especies no mamíferas, ofrece la posibilidad de realización de bioensayos para el estudio de los efectos de compuestos tóxicos directamente en el medio acuático. Entre ellos, la utilización de *Artemia* en agua salada o su equivalente *Daphnia* en agua dulce han sido ampliamente utilizadas para estudios de toxicidad aguda y crónica, tanto en su estado embrionario como en sus formas larvarias.

El sulfato de cobre y el formaldehído son comúnmente utilizados en la industria para la limpieza de superficies, en numerosos productos como detergentes, jabones, productos de limpieza y como biocida. Para estas aplicaciones se puede estimar que se liberan una cantidad significativa de ambos compuestos en las aguas residuales. Por lo anterior, el presente trabajo valora la toxicidad aguda del sulfato de cobre y

formaldehído, tanto en su toxicidad individual como mezclas, verificándolo a través de exposiciones sobre nauplios I de *Artemia*.

4. HIPÓTESIS

La presencia de la mezcla de agentes tóxicos como formaldehído y el sulfato de cobre afectan la supervivencia y el comportamiento de los nauplios I de *Artemia franciscana* de manera más significativa que en forma individual.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la toxicidad del sulfato de cobre y del formaldehído de forma individual y en mezcla, mediante un método de detección rápida y temprana en nauplios I de *Artemia franciscana*.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1.-Determinar el efecto tóxico agudo que se puede derivar de la presencia de sulfato de cobre.

5.2.2.-Determinar el efecto tóxico agudo del formaldehído.

5.2.3.-Determinar el efecto tóxico agudo de las mezclas químicas entre formaldehído y el sulfato de cobre.

5.2.4.- Estudiar los efectos en el comportamiento fototáctico de los nauplios I de *Artemia franciscana* a concentraciones subletales del sulfato de cobre y formaldehído.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Las condiciones que se siguieron en la realización de los ensayos estuvieron sujetas a los criterios de la OCDE (2008) (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos).

6.1. Agua marina sintética:

Para la preparación de agua de mar artificial se utilizó sal marina de la marca Sera (USA). Para ello se preparó una disolución al 3.3% de salinidad con agua destilada, ajustando el pH con una disolución de HCl 1M hasta alcanzar un intervalo de 8.2 a 8.4.

6.2. Obtención de los nauplios de *Artemia franciscana*

Los ensayos se realizaron con quistes (huevos) de *Artemia franciscana* (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA, utilizando la línea ARGENTEMIA Grade II Silver Label y que garantiza un mínimo de 260.000 huevos/g). A partir de los quistes se obtuvieron poblaciones homogéneas de nauplios (92% eclosión), con un tamaño de 500-525 μm . Para la obtención de nauplios se pesaron 0.1 g de quistes de *A. franciscana* y se incubaron durante 24 h en 150 mL de agua de marina sintética, manteniendo una oxigenación saturada y una temperatura de 25°C en baño María, aplicando iluminación con una lámpara de luz de 60 watts.

6.3. Determinación de la toxicidad aguda del sulfato de cobre y del formaldehído en nauplios I

Para la realización de los estudios de toxicidad (LC_{50}) se utilizó sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Baker) y formaldehído grado analítico (99% de pureza, Baker). Las soluciones patrón con sulfato de cobre se prepararon a concentraciones de 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4 mg/L y las de formaldehído a 0.54, 0.71, 0.89, 1.11, 1.32, 1.5, 1.8, 2.02, 2.17, 2.84, 3.59, 4.44, 5.37, 6.39, 7.48 $\mu\text{L/L}$.

La prueba letal 50 (LC_{50}) se realizó siguiendo la metodología propuesta por Meyer *et al.*, (1982), la cual se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte del

50% de los nauplios de *Artemia* en 24 horas. El desarrollo de esta prueba se inicio incubando los quistes de *Artemia* en agua marina sintética. Posteriormente, los nauplios libres se depositaron en una caja de petri en la que se adicionaron 5 mL de agua de mar artificial. Desde esta se transfirieron hacia la placa multipocillo, colocando 10 nauplios en 97 μ l de agua de mar sintética junto a 3 μ l de las soluciones patrón por cada pocillo; con cinco repeticiones por concentración. Como control se utilizaron 3 μ l de agua destilada. La incubación se realizó a 25°C en obscuridad y durante un periodo de 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se pasó a la lectura de la placa contabilizando el número de nauplios vivos y muertos en cada uno de los pocillos de cada concentración. La muerte de los nauplios se estableció por la falta total de movimiento durante 10 segundos de observación bajo el estéreo microscopio (10 y 40 X).

Los valores de LC₅₀ se obtuvieron calculando los logaritmos de las concentraciones de las soluciones patrón, relacionados con el porcentaje de mortalidad (% mortalidad vs Log Concentración).

6.4. Determinación de LC₅₀ en mezclas de biocidas

Para la determinación LC₅₀ de las mezclas de sulfato de cobre y formaldehido se utilizaron soluciones preparadas de acuerdo a la metodología indicada en las pruebas individuales, considerando las siguientes concentraciones:

Cobre: 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35, 1.65, 1.95, 2.25, 2.55 mg/L

Formaldehido: 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.67, 0.73, 0.80, 0.86, 0.94, 1.0, 1.1 μ L/L.

Estas concentraciones se eligieron con base a los valores de LC₅₀ a 24h para cada compuesto en forma individual a partir de concentraciones subletales, tomando LC₅₀/2, LC₅₀/4, LC₅₀/8 y LC₅₀/16 de acuerdo a lo propuesto por Fernández-Alba *et al.*, (2002); Koutsaftis y Aoyama (2007); Gaete y Chávez (2008) y Pavlaki *et al.*, (2011). La mezclas se combinaron a proporción 1:1.

6.4.1. Tipo de interacción

El tipo de interacción se determinó de acuerdo al modelo Proporción Sinérgica (PS) (Hewlett y Weber, 1969) y Concentración Adición (CA) (Anderson y Weber, 1975).

Proporción Sinérgica (PS) se determinó mediante la relación:

$$PS = \frac{LC50 \text{ de elemento químico individualmente}}{LC50 \text{ de la mezcla}}$$

Donde PS = 1 indica aditividad, mientras que P>1 indica sinergia y PS<1 indica antagonismo.

Concentración Adición (CA)

Este modelo asume que cuando dos tóxicos actúan de modo similar y se mezclan en cualquier proporción, estos se sumaran para dar la respuesta observada (Otitoloju, 2002). El valor de la LC₅₀ estimada se obtiene sumando los valores de LC₅₀ de los compuestos obtenidos experimentalmente de forma individual según su contribución en la mezcla de acuerdo a las proporciones probadas. Luego estos valores de LC₅₀ estimados son divididos por los valores obtenidos experimentalmente de la mezcla binaria, para así determinar la clase de acción conjunta de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{LC50 \text{ estimada}}{LC50 \text{ experimental de la mezcla}}$$

Donde CA = 1 indica que el efecto es aditivo, CA> que hay sinergia y que CA<1 que hay antagonismo.

6.5. Estudios de toxicidad subaguda: Inhibición del fototactismo

Los ensayos para valorar la capacidad fototáctica que poseen los nauplios I de *A. franciscana* previamente expuestas a los diferentes biocidas se desarrollaron en la cámara oscura siguiendo la metodología propuesta por Sánchez-Fortún y Bartolomé, (2005).

Este ensayo se basa en que la fuente de luz que se proyecta en la ventana terminal de la cámara atrae a los nauplios por su respuesta fototáctica. Si la exposición subletal al biocida afecta a los nauplios su capacidad fototáctica se ve reducida y éstos no serán capaces de realizar todo el recorrido de la cámara (desde la ventana proximal hasta la terminal). El número de individuos capaces de aproximarse a la fuente de luz disminuiría en una relación concentración dependiente.

Para la realización de los estudios de inhibición del fototactismo o concentración inhibitoria que afecta al 50% de la población (IC_{50}) se utilizaron nauplios I de *A. francisana* de 24 h de edad; los cuales se colocaron en los seis canales cámara oscura (Figura 4), cada uno con 5 mL de capacidad. En cada canal se incluyeron un total de 20 nauplios y posteriormente se agregaron las soluciones patrón individuales en concentraciones subletales de sulfato de cobre, (1.5, 0.9, 0.6, 0.3 mg/L) y formaldehído (0.658, 0.336, 0.280, 0.080 μ L/L) respectivamente y un control sin tóxico.

Para la realización del ensayo en las combinaciones binarias proporción 1:1, se utilizaron concentraciones de 0.15, 0.3, 0.45, 0.75 mg/L para sulfato de cobre mezcladas con 0.042, 0.125, 0.168, 0.329 μ L/L de formaldehído. Estas concentraciones se eligieron a partir de LC_{50} obtenida para cada compuesto. Las pruebas se realizaron en forma similar a las pruebas individuales.

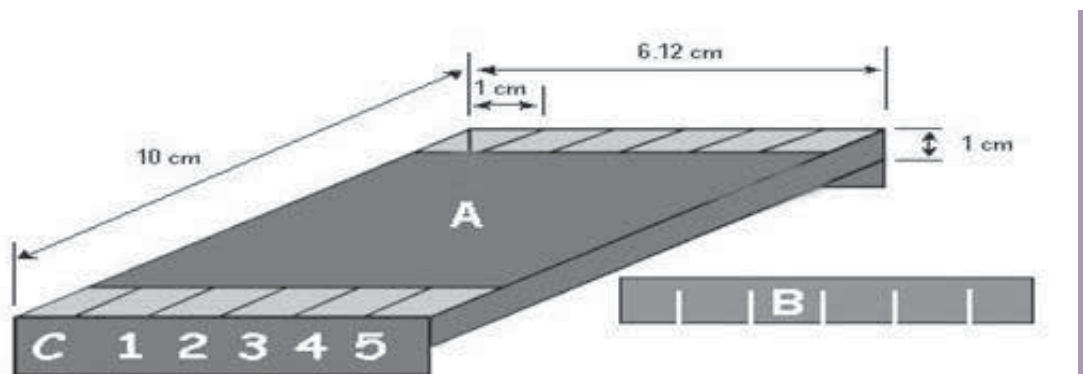


Figura 4. Esquema del diseño de la cámara oscura (A) y el elemento de cierre (B) empleados para la realización de los ensayos de inhibición del fototactismo.

6.6.- Modelación de la especiación química

En este estudio se examinó la viabilidad de utilizar una mezcla como un modelo basado en la suma de efectos para la evaluación de toxicidad de la mezcla entre cobre y formaldehído. Para lo cual se investigó el efecto de las condiciones fisicoquímicas de las soluciones (cobre y formaldehído) sobre la toxicidad aguda de los compuestos de manera individual y en mezcla en nauplios I de *A. franciscana*. Para ello se evaluó el análisis fisicoquímico (aniones y cationes) de las distintas soluciones de agua marina sintética (la solución de cobre solo y en combinación con el formaldehído) a fin de determinar la concentración de las distintas especies químicas presentes.

Para la obtención de las distintas especies se empleó el paquete computacional MINTeql+ que simula y obtiene las especies químicas predominantes a partir de parámetros como: pH, temperatura, fuerza iónica, concentraciones totales de iones metálicos y aniones determinados experimentalmente y las constantes de equilibrio, del producto y de la solubilidad. La composición química de las muestras fue evaluada mediante la siguiente metodología continuación:

a).- Análisis de aniones

Parámetro de laboratorio	Metodología
cloruros	NMX-AA-073-SCFI-01
Fosfatos	NMX-AA-029-SCFI-02
Sulfatos	NMX-AA-074-1981
Alcalinidad Total	NMX-AA-036-SCFI-01
N. Nitratos	NMX-AA-079-SCFI-02

b).- El análisis de metales (calcio, magnesio, sodio, potasio, cobre) se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica.

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de la LC_{50-24h} e IC_{50} (Concentración que inhibe la capacidad fototáctica del 50% de los nauplios de *A. franciscana*) en cada uno de los bioensayos fueron calculados a través del análisis Probit (Finney, 1971) y del análisis de regresión polinomial (ecuación polinómica cúbica) $f(x) = y_0 = ax^3 + bx^2 + cx + b$ y (ecuación polinómica, cuadrática) $f(x) = y_0 = ax^2 + bx + c$, modelos que representaron mejor el comportamiento de los datos. Donde (X) representa la concentración y (Y) la mortalidad o la inhibición según corresponda.

Los resultados se expresan como la media $\pm z^*\epsilon$ y la media $\pm 2*s$ (teorema de Tchebysheff) de 5 experimentos (n=10). Usando las curvas de concentración-respuesta y sus intervalos de confianza (95%). Las graficas se realizaron con el programa Sigma Plot (versión11, SPSS Inc).

Para establecer las diferencias entre la respuesta inhibitoria al fototactismo entre las diferentes concentraciones se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (concentración del tóxico vs porcentaje de inhibición fototáctica). Para ello se utilizó el programa JMP (Ver 6). Para identificar la fuente de variación se complementó con una prueba a posteriori de Tukey ($p < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. Toxicidad aguda del sulfato de cobre y formaldehido

Los resultados de la prueba de toxicidad aguda del sulfato de cobre y del formaldehido en nauplios I de *A. franciscana* se presentan en la figura 5. Los valores de LC_{50} fueron 1.24 mg/L con 95% de confianza (LC. 1.031 -1.689) y 1.38 μ L/L (0.224-2.256) para sulfato de cobre y formaldehido respectivamente.

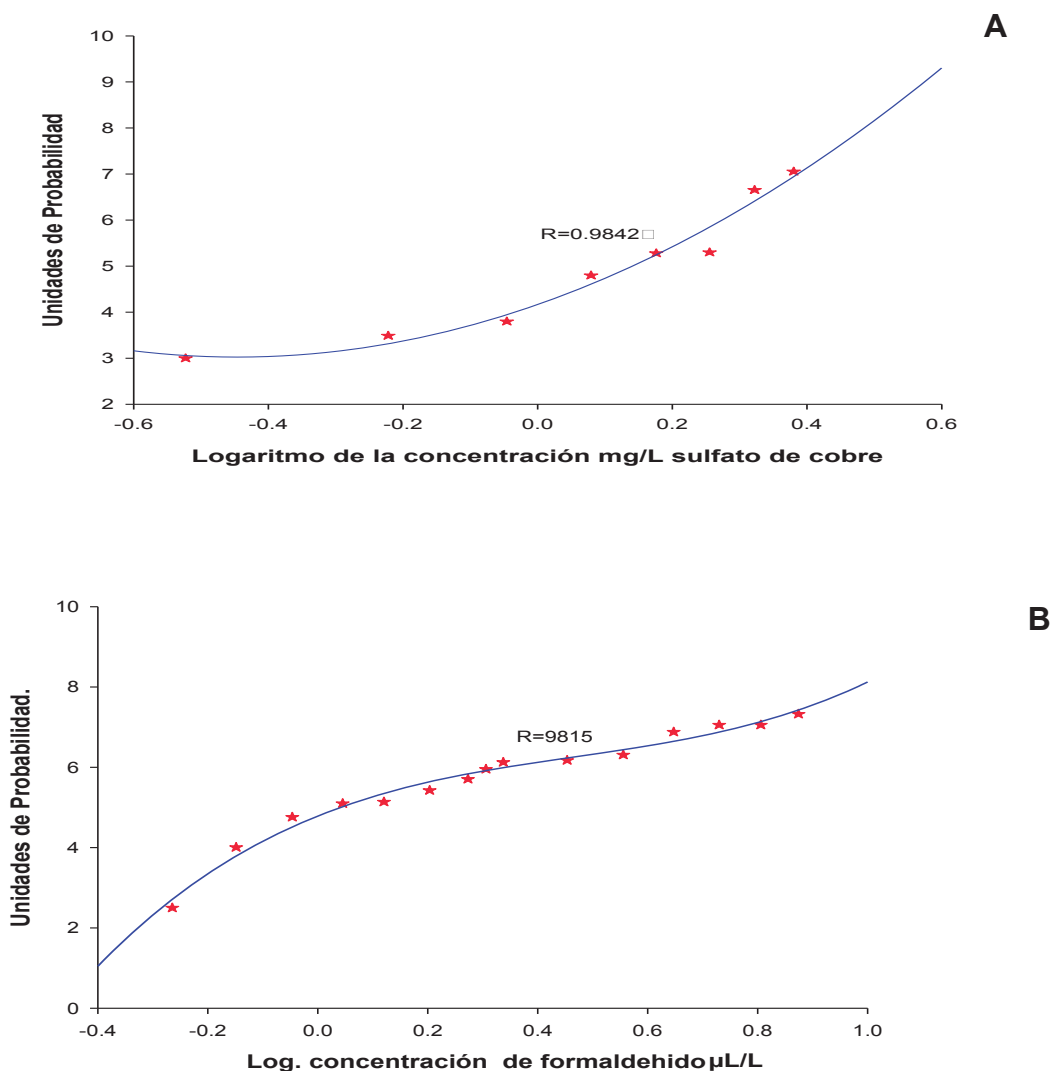


Figura 5 A y B. Modelos de regresión que mejor ajustaron al comportamiento de los datos en nauplios I de *A. franciscana* por la exposición al sulfato de cobre y al formaldehido al 37%

7.2. Toxicidad de la mezcla sulfato de cobre y formaldehido

Los resultados de toxicidad aguda de las mezclas binarias en la proporción 1:1 utilizando sulfato cobre y el formaldehido 37% (LC_{50}) se resumen en la tabla 2, la cual muestra el tipo de interacción de la mezcla de acuerdo a los modelos: Proporción Sinérgica (PS) y Concentración Adición (CA).

TABLA 3. Valores LC_{50-24h} , en mezclas binarias Cu-Formaldehido en proporción 1:1, con un 95% de confianza

Mezcla biocidas Proporción 1:1	LC_{50} (95%L.C)	PS	CA	Tipo Interacción
Cobre LC_{50-24h} (1.16 mg/L)	(1.031 -1.689).	1.08	2.06	Sinergia
Formaldehido LC_{50-24h} (0.71 μ L/L)	(0.224-2.256)	1.94	2.9	Sinergia

PS: Proporción Sinérgica y CA: Concentración Adición.

7.3. Inhibición del fototactismo: Inhibición fototáctica de *A. franciscana* en presencia sulfato de cobre y formaldehido

Modelos de regresión que mejor ajustaron la inhibición fototáctica del sulfato de cobre y de formaldehido evaluados en nauplios I de *A. franciscana*. L.C con 95% de probabilidad de acuerdo al teorema Tchebysheff, en función de las medias y sus respectivas desviaciones estándar se muestran en la figura 6

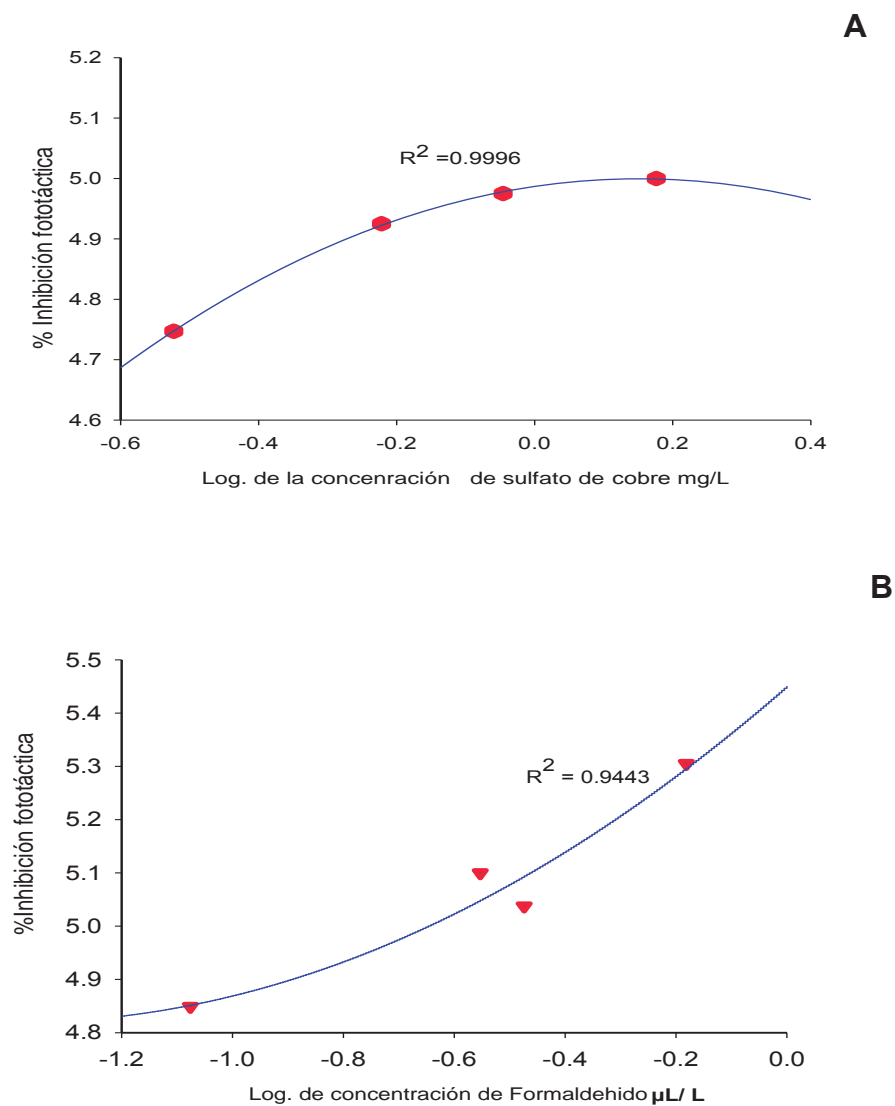


Figura 6. A. IC₅₀ para sulfato de cobre (1.2 mg/L) y B. para el formaldehido 37% (0.19µL/L) en nauplios I de *A. franciscana* de 24-h.

7.3.1. Inhibición fototáctica de la mezcla de formaldehído y sulfato de cobre.

Modelos de regresión que mejor ajustaron a los datos de Inhibición fototáctica de nauplios I de *A. franciscana* por la exposición de la mezcla de sulfato de cobre-formaldehído en proporción 1:1, se muestran en la figura 7.

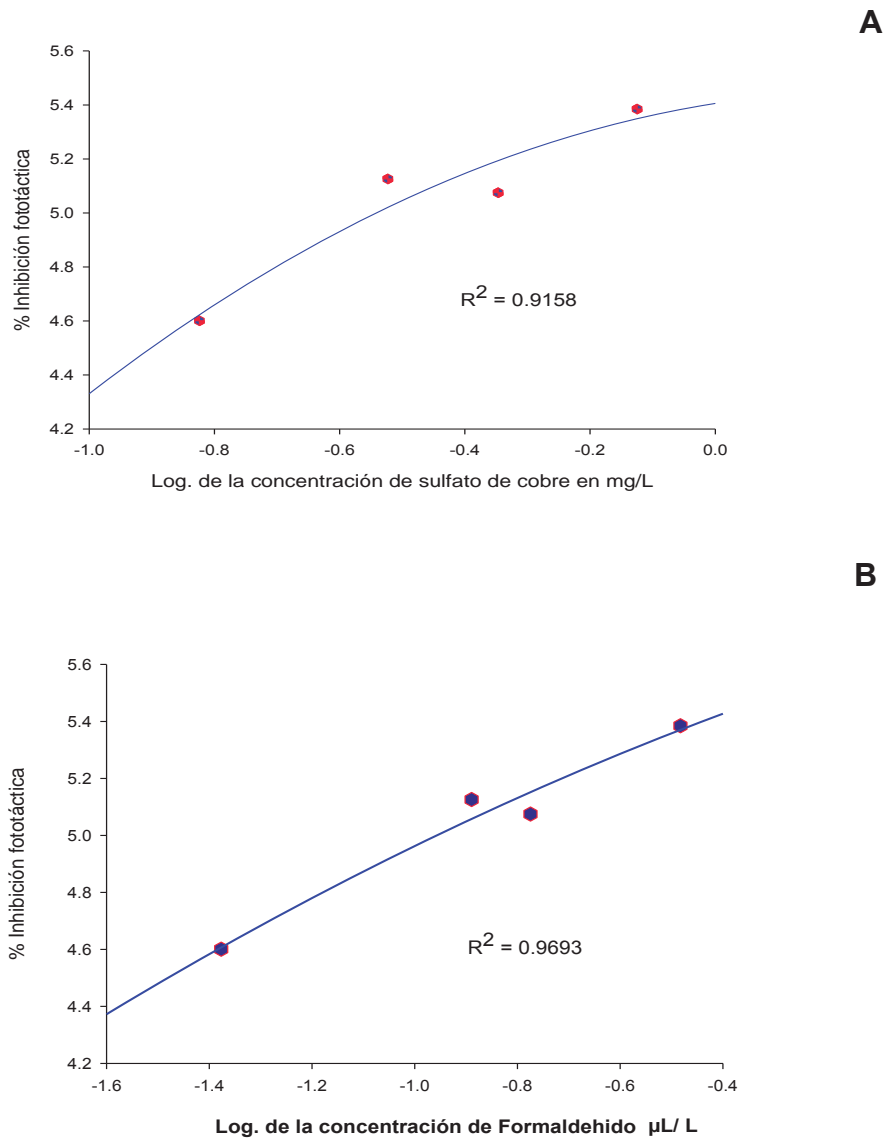


Figura 7. A. Se presentan las IC_{50} del formaldehído al 37% ($0.12\mu\text{L/L}$) y B del sulfato de cobre (0.3 mg/L) con 95% de confianza de acuerdo al teorema Tchebysheff.

7.3.2. Combinaciones binarias del formaldehído y sulfato de cobre

Los resultados de las combinaciones binarias entre el formaldehído y el sulfato de cobre se presentan en la figura 8. En la gráfica se aprecia que los compuestos de manera individual tienen un menor efecto que cuando se encuentran combinados.

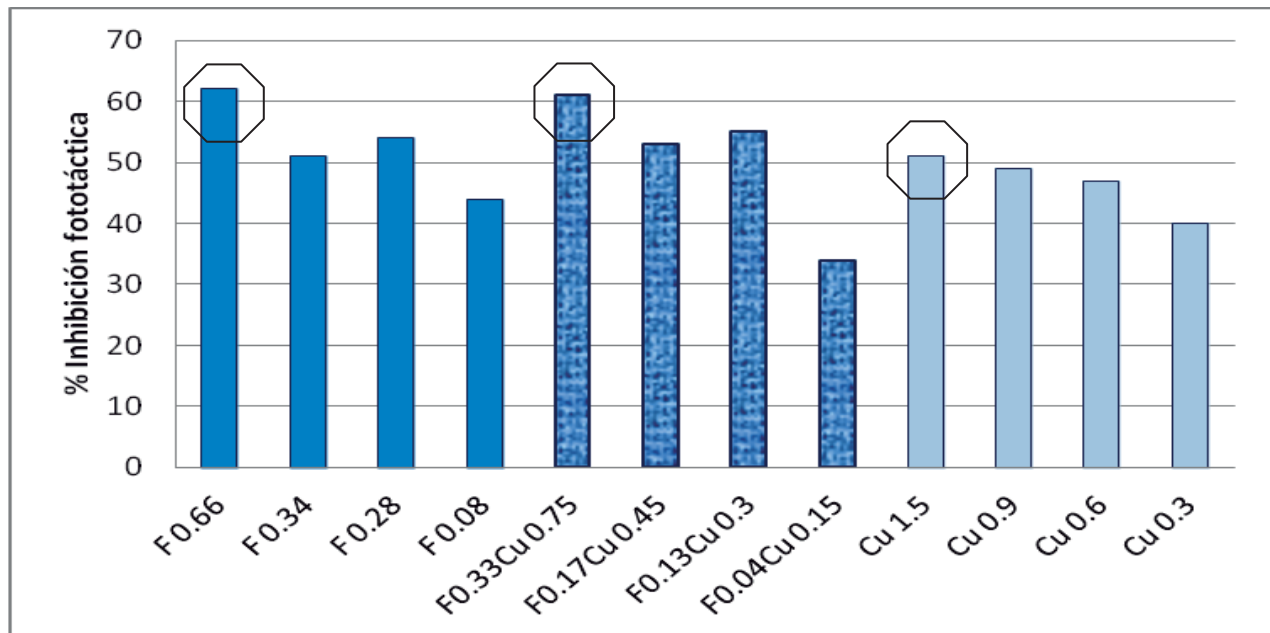


Figura 8. Inhibición del fototactismo en los nauplios I de *A. franciscana* del sulfato de cobre y del formaldehído de manera individual y sus combinaciones proporción 1:1.

Los análisis de la varianza confirmaron que las concentraciones de sulfato de cobre ($P > 0,0001$) y del formaldehído ($P > 0,0009$) (Figura 9 A y B) y sus combinaciones binarias ($P > 0,0015$) (Figura 11) tuvieron un efecto significativo sobre la inhibición fototáctica con respecto al valor asintótico ($P = 0,05$).

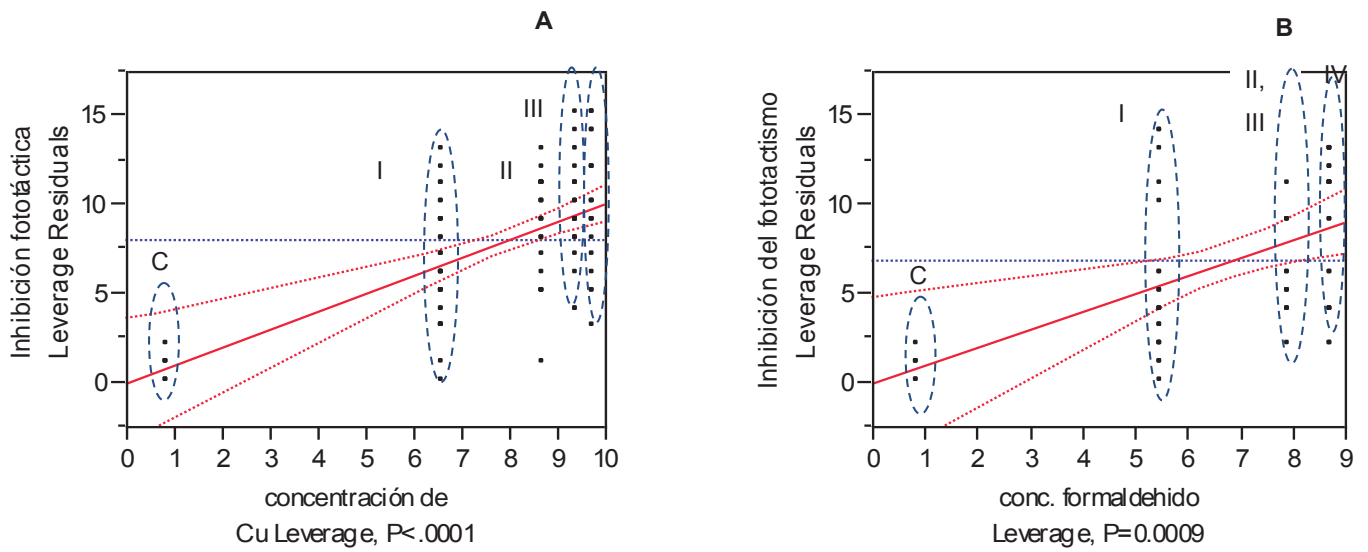


Figura 9. Análisis de varianza del comportamiento fototáctico de nauplios I *A. franciscana* en presencia de: A. sulfato de cobre, donde C= control (sin tóxico) y concentraciones: I= 0.3, II= 0.6, III=0.9, IV=1.5 mg/L y B. formadehido al 37% I= 0.08, II= 0.28, III= 0.34, IV=0.66 μ L/L.

El análisis de la varianza indica que las concentraciones de formaldehído en combinación con el sulfato de cobre en proporción 1:1 tuvieron un efecto significativo ($P= 0.0015$) sobre la inhibición fototáctica con respecto al valor asintótico ($P= 0,05$). (Figura 10).

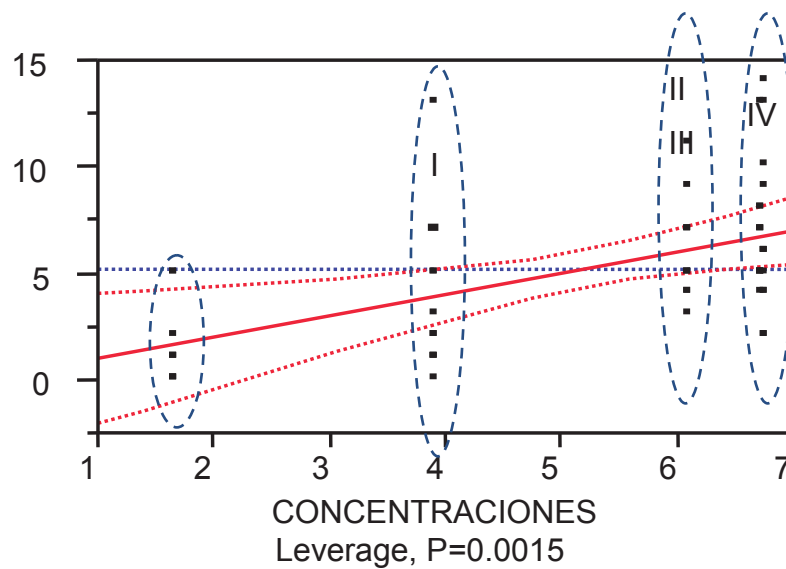


Figura 10. Análisis de la varianza de la mezcla de los compuestos en proporción 1:1. C= control (sin tóxico) y las concentraciones: I= (F0.4y Cu0.15) II= (F0.13 y Cu0.3) III= (F0.17y Cu0.45) IV= (F0.33 y Cu0.75) mg/L y μ L/L respectivamente.

7.4.- Modelación de la especiación química

Los resultados mostraron que la presencia de metales como sodio, magnesio, potasio, cobre, cloruros y carbonatos, además de la presencia de compuestos orgánicos y el pH influyen las especies químicas de cobre. Lo anterior puede generar una diversidad de especies químicas con diferentes características presentes en las soluciones.

La composición química de las muestras (soluciones) evaluadas se presenta a continuación:

Tabla 4. Aniones (mg/L)

Parámetro laboratorio	Solución Formaldehido	Solución cobre	mezcla 1:1
Cloruros	1998,80	2272,92	20243,72
Fosfatos	<0,21	<0,21	<0,21
Sulfatos	1043,24	5381,08	2921,62
Alcalinidad Total	34	68	56
N. Nitratos	1,08	9,61	3,10

Tabla 5. Metales (mg/L)

MUESTRA	Cu	Ca	Mg	Na	K
BCO SMS	<LD	333±2	2,026±12	5,689±9	214±2
SMS- sulfato de cobre(a).	950±2	364±8	1,711±15	7,326±5	217±2
SMS Formaldehído(b).	– 1±0.1	335±2	1,486±12	7,368±3	357±4
SMS -1:1 (a y b)	1,358±2	328±2	1,598±13	8,100±4	173±2

SMS. Solución marina sintética.

En la figura 11 se resumen las especies químicas de las soluciones: blanco, cobre, formaldehído y la mezcla 1:1. En ella se observa que las especies químicas que predominan son las especies de cobre libre Cu^{2+} y $\text{Cu}_3(\text{OH})_4^{2+}$ siendo esta última especie la que se encuentran en mayor concentración en todas las soluciones (cobre y la mezcla), mientras que en el blanco y en la solución de formaldehído están presentes en cantidades despreciables.

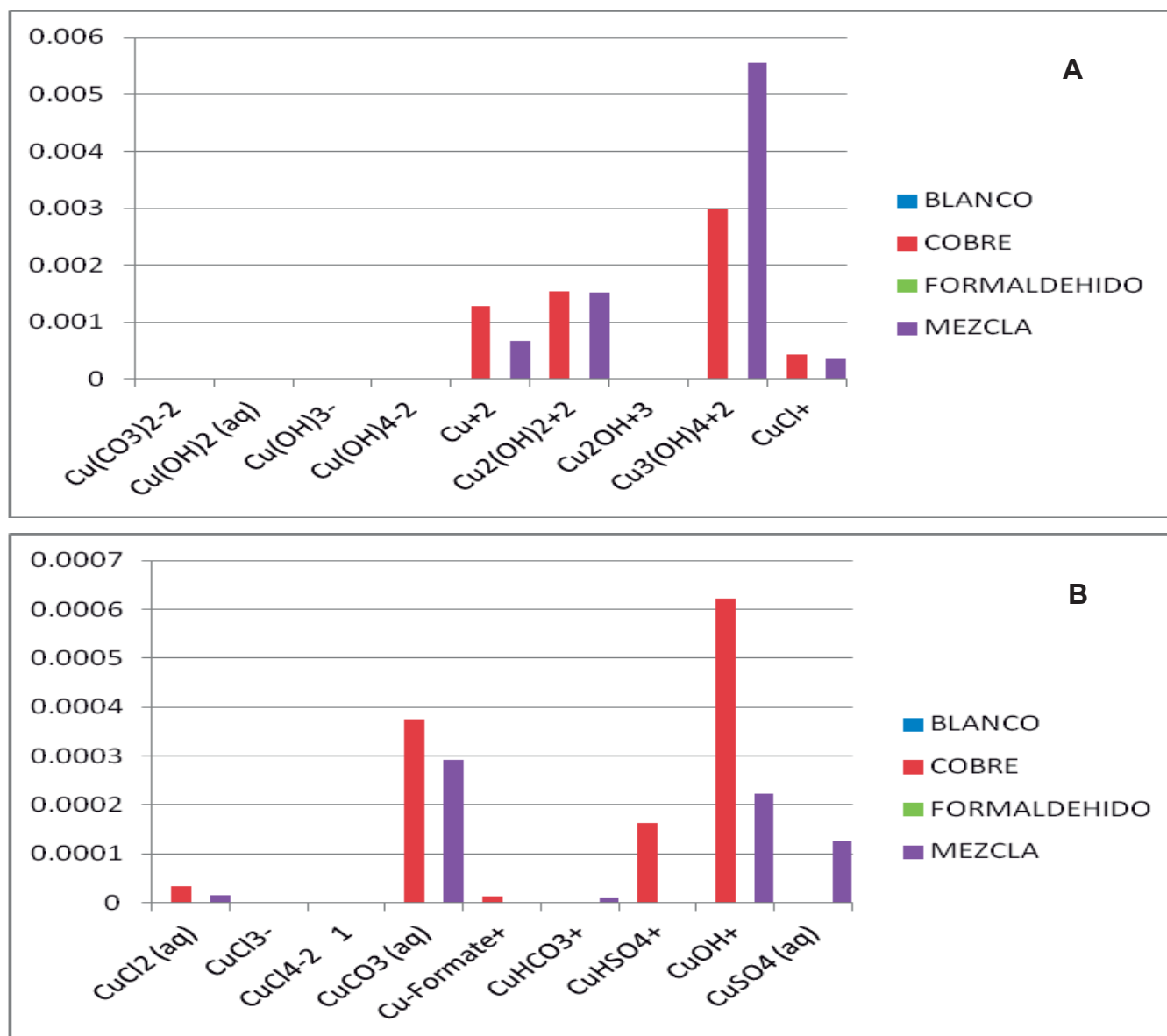


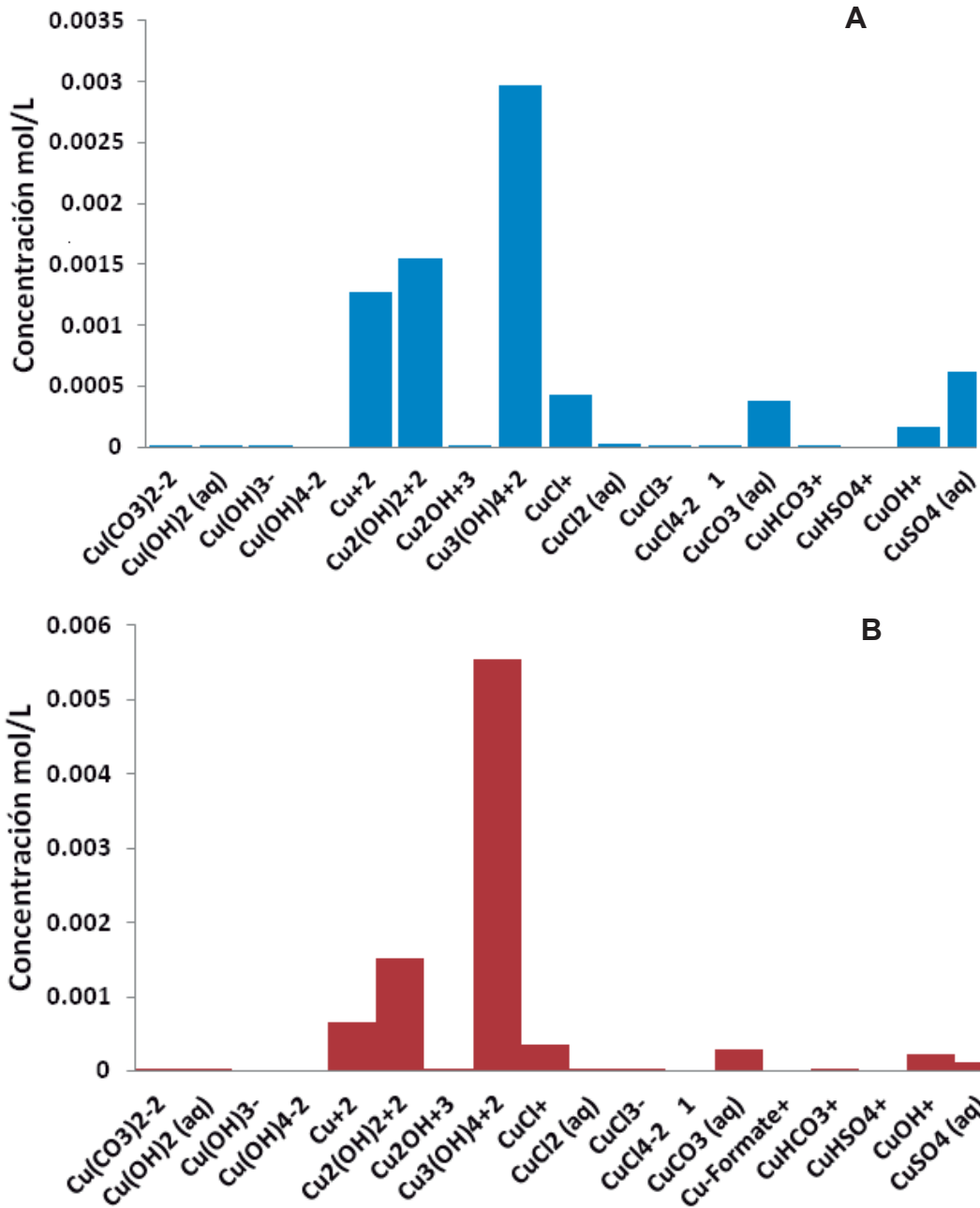
Figura 11 A Y B. Especiación del sulfato de cobre, se presentan las especies predominantes de cobre en la soluciones: blanco, cobre, formaldehído, mezclas 1:1.

De las especies químicas de cobre que se reportan en la literatura se puede apreciar que en el presente trabajo, la mayor parte de estas son de cobre (II) tal como se muestra en la tabla 4. Estas especies químicas presentes en las soluciones evaluadas, juegan un papel importante en la toxicidad pues podemos suponer que éstas podrían ser responsables de la letalidad (concentración que mata el 50%) de los nauplios de *A. franciscana* (Figura 5 AY B).

Tabla 6. Modelado de especiación química del cobre.

	Concentración Sol. Cu mo/L	Concentración Mezcla 1:1mol/L
Cu^{2+}	1.2×10^{-3}	0.6×10^{-3}
$\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$	1.5×10^{-3}	1.5×10^{-3}
$\text{Cu}_3(\text{OH})_4^{2+}$	3.0×10^{-3}	5.5×10^{-3}
CuCl^{1+}	0.4×10^{-3}	0.3×10^{-3}
CuCO_3^0	0.4×10^{-3}	0.29×10^{-3}
CuOH^{+1}	0.6×10^{-3}	0.22×10^{-3}
CuSO_4	0	0.13×10^{-3}
CuHSO_4^{+1}	0.16×10^{-3}	1.8876×10^{-11}

En las figuras (12 A Y B) y 13 (A Y B), se aprecia la especiación química obtenida tanto de la solución de sulfato de cobre como de la mezcla 1:1 respectivamente. Lo anterior nos permite observar claramente las especies de cobre y formiato.



12. Especiación química de cobre: A) En solución de sulfato de cobre B) Mezcla 1:1(sulfato de cobre y formaldehído)

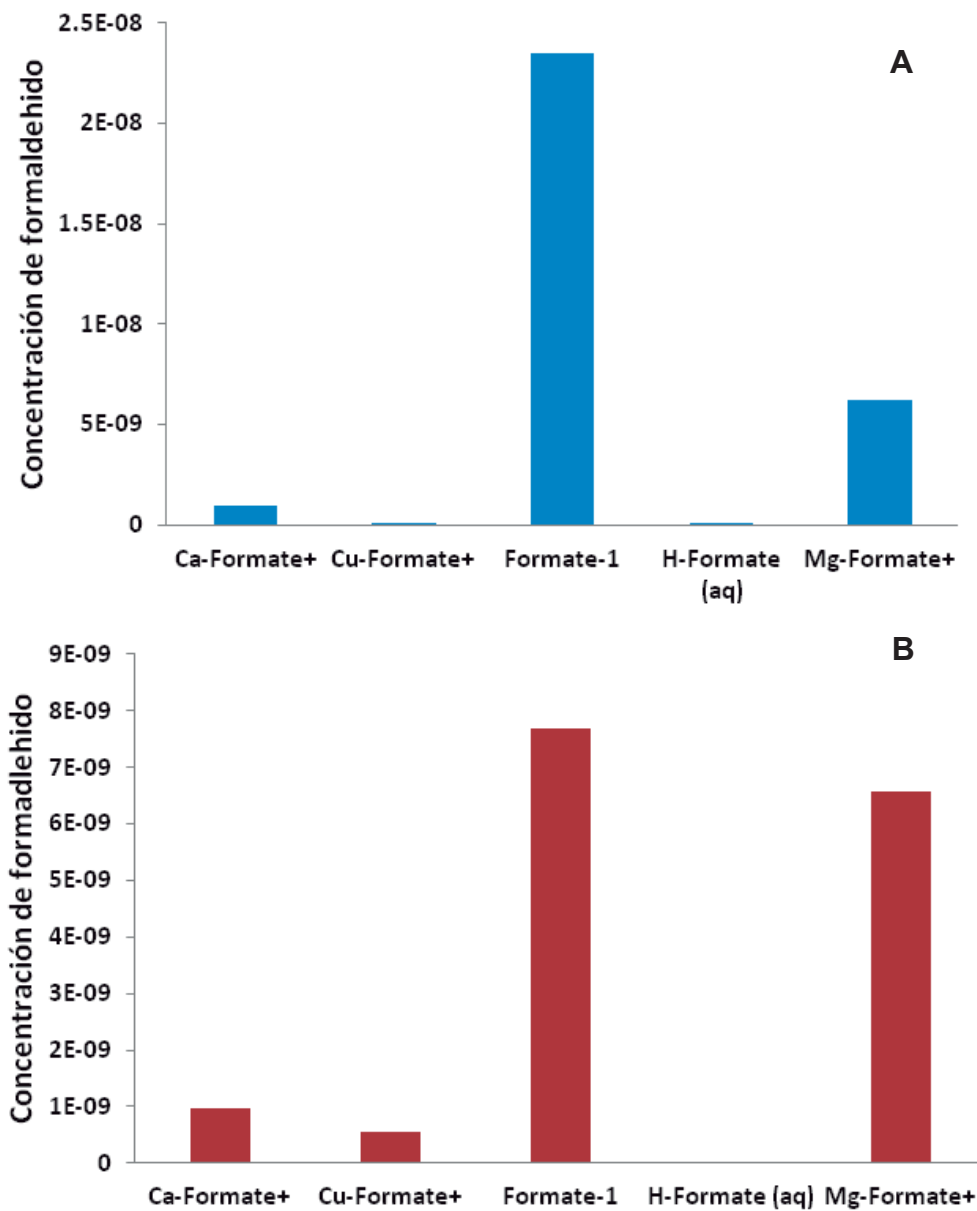


Figura 13. Especiación química de formaldehído; A) En solución de formaldehído y B) en mezcla 1:1.

8. DISCUSIÓN

8.1. Toxicidad aguda de cobre y del formaldehído

La clasificación de toxicidad aguda propuesta por la OCDE para la determinación del riesgo ambiental de los distintos contaminantes incluye: a) Clase I. Todos aquellos compuestos que presentan una LC_{50} inferior a 1 mg/L; b) Clase II. LC_{50} obtenida se encuentra entre 1 y 10 mg/L, y c) Clase III. LC_{50} se ubica en el intervalo de 10 a 100 mg/L. El resultado de la toxicidad aguda del sulfato de cobre en nauplios I de *A. franciscana* (1.2 mg/L) del presente trabajo se situó dentro de la Clase II por lo que podemos considerarlo como medianamente tóxico.

Por otro lado, la Norma Oficial Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996), establece que los límites máximos permisibles del cobre en las descargas de aguas residuales para aguas costeras (sin especificar bioindicador) es 2 a 4 mg/L (DOF, 1996). Este intervalo es mayor a la concentración que provocó la mortalidad del 50% de los nauplios I de *Artemia* en este estudio. Este dato es relevante ya que para este bioindicador concentraciones como las marcadas en la NOM pueden poner en riesgo a las poblaciones de *Artemia*.

Los datos en la literatura muestran que la sensibilidad de las especies depende de los contaminantes a los que están expuestos. Por ejemplo, la toxicidad aguda (LC_{50-24}) de cobre sobre *Daphnia magna* y *D. pulex* está considerada en el intervalo de 1.0 a 5.2 $\mu\text{g/L}$ (Gaete y Chávez, 2008), en tanto que Hee *et al.*, (2005) reporta 4 $\mu\text{g/L}$ y 12 $\mu\text{g/L}$ para agua suave y agua dura, respectivamente. Kokkali (2011) reporta un valor de $LC_{50} 19.5 \text{ mg/L}$ en *A. salina*. En este trabajo para *A. franciscana* se obtuvo una LC_{50-24} de 1.25 mg/L (1250 $\mu\text{g/L}$). Lo anterior sugiere que las diferencias mostradas entre los valores de LC_{50} en cada uno de los casos se deben tanto al bioindicador como a las características fisicoquímicas del agua.

Los resultados de toxicidad aguda obtenidos en nauplios I por la exposición al formaldehído (37%) marcaron 1.38 $\mu\text{L/L}$ como la concentración letal 50. De acuerdo a la clasificación propuesta por la OCDE, este compuesto se sitúa dentro de la clase I, quedando dentro de los compuestos que son altamente tóxicos.

Los invertebrados acuáticos tienen una amplia gama de respuestas al formaldehído. Sin embargo, una de las especies más sensibles reportadas es *Cypridopsis* spp. (Crustáceo ostracodo) con una EC_{50} de 3.6 mg/L mientras que una de especies más tolerante es *Crangon crangon* (Camarón arena) con EC_{50} 330 a 1000 mg/L (Bartolomé, 2005).

8.2. Toxicidad de las mezclas químicas

Para predecir los efectos de los contaminantes químicos sobre los sistemas acuáticos se debe tomar en consideración la acción conjunta de las mezclas de los contaminantes químicos. En este sentido, los resultados de este estudio indican que las diversas mezclas de agentes químicos como el cobre y el formaldehído (LC_{50} de 0.3 mg/L y 1.2 μ L/L, respectivamente) causaron efectos tóxicos sobre *A. franciscana* superiores a los productos individuales. Esta respuesta se considera como interacción sinérgica.

En estudios previos se observó que en la mezcla Zn:Cu, el cobre ejerce un efecto sinérgico sobre el zinc al aumentar su proporción en la mezcla; en tanto que el zinc provoca un efecto antagónico cuando está en alto porcentaje en la mezcla (Gaete y Chávez, 2008). Por su parte, Parrott y Sprague (1993) notaron mayor alteración de la estructura del ADN y proteínas en el pez carpita cabeza (*Pimephales promelas*; Rafinesque, 1820) provocadas por el cobre y zinc individualmente, que cuando estos metales estaban en mezcla. Utgikar *et al.*, (2004) describieron una interacción sinérgica entre el zinc y el cobre sobre *Vibrio fischeri*, el cual es atribuible al cobre principalmente. Asimismo, Khangarot *et al.*, (1982) observaron el efecto sinérgico entre estos metales en igual proporción sobre el caracol de agua dulce (*Lymnaea acuminata*). Estas diferencias podrían ser atribuibles a las distintas sensibilidades y características fisiológicas entre los organismos. El efecto sinérgico comúnmente está dado entre mezclas de sustancias de la misma naturaleza; sin embargo, la evidencia es limitada en mezclas de compuestos con propiedades distintas.

Por lo anterior es difícil establecer comparaciones entre la interacción del sulfato de cobre y formaldehído 37% con otros estudios que utilicen el mismo bioindicador; ya que las investigaciones previas relacionada con estas mezclas son limitadas. Esto llama la atención dado que ambos compuestos son ampliamente utilizados como biocidas en las industrias desalinizadoras, acuicultura, en la industria de los detergentes, entre otros.

8.3.-Especiación química del cobre.

Si se considera que el ion Cu^{2+} es la especie más tóxica por ser la más biodisponible (González-Gonzales y Santana Casiano, 2006; Christiansen *et al.*, 2011), se podría suponer que en el presente trabajo la mortalidad de los nauplios observada fue resultado del Cu^{2+} conjuntamente con $\text{Cu}_3(\text{OH})_4^{2+}$ (que está presente en mayor concentración). Las otras especies como CuCl^+ , CuCO_3^0 , CuOH^+ , se consideran especies insolubles y tienden a precipitar por lo que su efecto tóxico podría ser menor. Cuando se observan las especies **presentes** en la mezcla sulfato de cobre con formaldehído en proporción 1:1, la concentración del ion Cu^{2+} representa la mitad que en la solución individual, en tanto que la concentración de $\text{Cu}_3(\text{OH})_4^{2+}$ constituye el doble (figura 12).

Los resultados de la LC_{50} del cobre en la mezcla muestran un efecto sinérgico que indica un incremento en la toxicidad cuando este se encuentra combinado con el formaldehído (tabla 3). No obstante, que el ion cobre presente en menor concentración implicaría su menor toxicidad en la mezcla (figura 12B). Lo anterior no concuerda con los datos de toxicidad de dicha mezcla ya que esta resultó más tóxica que la solución de cobre individual. Cabe mencionar que la mezcla contiene iones de formiato¹⁻ y cobre Cu^{2+} probablemente son a los cuales se debe el efecto sinérgico de la mezcla (ensayos de letalidad figura 7).

8.4.- Especiación química del formaldehído.

Dado que la dureza del agua es un factor que influye en los efectos tóxicos de los metales pesados en organismos acuáticos, a medida que aumenta su dureza la toxicidad de metales pesados se reduce. Lo anterior es resultado de la competencia por sitios de captación en los organismos tanto por los metales pesados como por los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . En la naturaleza, Ca y Mg están presentes en concentraciones mucho más altas que los metales pesados. Por lo tanto, al competir con los metales pesados bloquean su acceso a los organismos acuáticos. Los niveles de Ca y Mg son importantes con respecto a los efectos tóxicos de metales pesados en la biota en los sistemas acuáticos (Yim *et al.*, 2006).

Considerando que el formaldehído por su estructura química tiende a oxidarse hasta ion formiato (COO^{-1}), en la especiación química se considero este último. De tal manera que se obtuvieron algunas especies químicas solubles de formiato como: el formiato-Ca, formiato-Cu y ácido fórmico, todos ellos en cantidades despreciables. Las especies predominantes fueron el ion formiato $^{-1}$ y el formiato de magnesio considerando la concentración de esas especies se les puede considerar responsables de la mortalidad de los nauplios en los ensayos de LC_{50} .

Analizando los resultados de letalidad para el formaldehído (figura 5) y el análisis de la especiación química figura 13A se ve al ion formiato $^{-1}$ como la especie predominante y las otras especies están formando complejos con los cationes Ca^{2+} , Cu^{2+} y Na^{1+} de tal manera que al formar los complejos con los cationes el formaldehído podría disminuir la dureza de la solución e incrementar la toxicidad del ion formiato $^{-1}$ por encontrarse como ion libre (Yim *et al.*, 2006 y Christiansen *et al.*, 2011).

De acuerdo con los ensayos de letalidad el formaldehído presentó efecto sinérgico cuando esta combinado con el sulfato de cobre (tabla 3). Sin embargo, se observó que el ion formiato $^{-1}$ siguió predominando aunque como complejo con Mg e incrementó su concentración considerablemente en la mezcla. Por ello, se puede suponer que este complejo también podría estar participando como parte de la toxicidad tanto en la solución de formaldehído como en la mezcla (figura 13B).

De acuerdo a lo antes mencionado, en la mezcla tanto las especies de Cu^{2+} y el ion formiato⁻¹ están presentes en una menor concentración, pero aún así presentan un efecto sinérgico. Lo anterior se podría atribuir a que el ion formiato⁻¹ atrapa iones Ca^{2+} y Mg y en menor proporción iones de cobre. La disminución de la dureza o afecta los iones de cobre libre, por lo que estos quedan biodisponibles como ion Cu^{2+} al igual que el ion formiato⁻¹. Al estar ambas especies biodisponibles al mismo tiempo se ocasionó un efecto sinérgico entre ellas.

Comparando las especies del ion formiato⁻¹ presentes en la figura 13A con las de la figura 13B se puede apreciar que este ion predomina en su forma libre en ambas soluciones por lo que a este se le considera como principal responsables de la toxicidad del formaldehído (Buchmann *et al.*, 2004).

8.3. Inhibición del fototactismo

En el presente trabajo se evaluó el comportamiento fototactico de los nauplios de *Artemia*, que de manera natural tienen una respuesta positiva hacia la luz. De esta forma se determinó la respuesta a las condiciones ambientales particulares (presencia de tóxicos). Los resultados confirmaron que los cambios en el comportamiento (alteración del fototactismo) son los principales indicadores de su sensibilidad a la contaminación. Los valores de inhibición fototáctica obtenidos por la exposición de nauplios I de *A. franciscana* de 24-h en un tiempo de 2 h de exposición al formaldehído indican que el 50% de los nauplios I presentan inhibición fototáctica equivalente a un 1/3 del valor de LC_{50} . En el caso de el sulfato de cobre el 50% de los nauplios I presentan inhibición fototáctica (IC_{50}) en una concentración similar al valor de la LC_{50} .

Por otro lado, en combinación el formaldehído y el sulfato de cobre la inhibición fototáctica es de 1/9 y 1/20, respectivamente del valor de la LC_{50} de los compuestos individuales. De esta forma se demuestra que en la mezcla de compuestos se acentúa el efecto del comportamiento fototáctico (negativo) en los nauplio I, lo que puede representar un mayor riesgo para los ecosistemas acuáticos.

Los resultados obtenidos en este trabajo no se pueden contrastar debido a la carencia de datos existentes en la literatura acerca del efecto inhibitor del fototactismo por exposiciones a contaminantes acuáticos.

- **9.-CONCLUSIONES**

- ✚ El impacto toxicológico está relacionado tanto con la especie química, como con el tipo de contaminante y la interacción entre ellos.
- ✚ Las mezclas de este estudio establecen un mayor riesgo toxico que los compuestos de manera individual.
- ✚ Una alteración en la conducta; llega a ser tan importante como la mortalidad, pues no solo se afecta individualmente a los organismos sino a toda lapoblación .

10.-BIBLIOGRAFÍA

Adams W. J., Blust R., Brogmann U., Brix K. V., Deforest D. K., Green A. S., Meyer J. S., McGeer J. C., Paquin P. R., Rainbow P. R., Wood, C. M. 2010. The Tissue Residue Approach for Toxicity Assessment (TRA). *Integrated Environmental Assessment and Management*. 7: 75-98.

Ahbu-Olayan A y Thomas, BV. 2006. Brine Shrimp, *Artemia franciscana* as a tool Biocides toxicity in Kuwait bay, off the Arabian Gulf. *Departament of Environmental Engineering*. 1: 1-71.

Albert L.A. 2010. Toxicología Ambiental, segunda ed., Limas, México D.F.

Anderson P.D y Weber, L.J. 1975. The toxicity to aquatic population of mixtures containing certain heavy metals. In: Proceeding of the International Conference on Heavy metal in the Environment, Institute of Enviromental Studies, University of Toronto. 933-953pp.

Ansari T.M., Mar, I.L., Tariq N. 2004. Heavy Metals in Marine Pollution Perspective-A Mini Review. *Journal of Applied Sciences* 4(1): 1-20.

Baas J., Jager, T., Kooijman, S.A.L.M. 2010. A model to analyze effects of complex mixtures on survival. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 669–676.

Baker S., Herrchen, M., HundRinke, K., Klein, W., Kordel, W., Peijnenburg W. y Rensing, C. 2003. Underlying issues including approaches and informatio needs in riskassessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56: 619.

- Banks K.P., Turner, S., Matthews, C.** 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 60:28-36.
- Bartolomé C.M. y Sánchez-Fortún S.** 2007. Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y salud pública sobre *Artemia franciscana*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 3(1):90-97.
- Bartolomé C. M.C.** 2005. Valoración del riesgo toxicológico sobre larvas de *artemia* de desinfectantes utilizados en torres de refrigeración. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid: 8-185.
- Brigmann G. y Kuhn, R.** 1977. The effects of water pollutants on *Daphnia magna*. *ZWasser-Abwasser-Forsch.* 10:161-166.
- Buchmann K., Bresciani, J., Jappe C.** 2004. Effect of formalin treatment on epithelial structure and mucos cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. *Journal of Fish Diseases*. 27(2): 99-104.
- Bucker H., y Horneck, G.** 1975. The biological effectiveness of HZE-particles of cosmic radiation studied in the Apollo 16 and 17 Biostack experiments. *Acta Astronaut*, 2 (3-4):247-264.
- Burkhead J.L., Gogolin Reynolds, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Pilon, M.** 2009. Tansley Review. Copper homeostasis. *New Phytologist*. 182, 799–816.
- Byung-Eun K., Tracy, N., Dennis, J.T.** 2008. Mechanisms for copper acquisition, distributions and regulation. *Nature Publishing Group*. 4:(3) 2–11.

- Caldwell S.G., Bentley, G. M., Olive J. W. P.** 2003. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehyde.
- Carbonell G., Tarazona, J.V.** 1993. A proposed method to diagnose acute copper poisoning in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment*. 1993:1329–1334.
- Carvalho y Fernandes.** 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251:109–117.
- Casarett y Doull's.** 2008. Toxicology The Basic Science of Poisons, Septima ed. McGraw-Hill, Kansas City, Kansas.
- Castañe P. M., Topalián, M. L., Cordero, R.R., Salibián A.** 2003. Influencia de los metales pesados en el medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología*. 20:13-18.
- Christiansen S.K., Holm, E.P., Borggaard, K.O., Hauschild, Z.M.** 2011. Addressing speciation in the effect factor for characterization of fresh water ecotoxicity the case of copper. *Life Cycle Assess.* 16: 776- 773.
- Cobelo García, A., Prego, R., Nieto, O.** 2003. Chemical speciation of dissolved lead in polluted environments a case of study: the Pontevedra (Nw Spain). *Ciencias Marinas*. 29: 377-388.
- Colin Baird.** 2009. Química ambiental Editorial reverté.

- Connan S y Stengel D.B.** 2011. Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 1. Interactive effects on photosynthesis, growth, and copper accumulation. *Aquatic Toxicology* 104: 94–107.
- Contreras L., Moenne, A., Correa, J.A.** 2005. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *Journal of Phycology*. 41, 1184–1195.
- Cotton Fa, Wilkinson G.** 1988 . Advanced Inorganic Chemistry. Quinta Ed. New York: Wiley and sons. USA.
- Dafforn K.A., Lewis, J.A., Johnston,E.L.** 2011. Antifouling strategies: History and regulation. Ecological impacts and mitigation. *Marine pollution Bulletin*.62:453-465.
- Barceló Q.I., Solis, C.H., Ávila, P.P., González, C.C., Bussy, A.L.** 2010. Determinación experimental de las especies de Fe, Mn y Cu en el agua de la Presa J.A. Alzate, Edo. de México. *Revista de la Sociedad Química de México* 43,43-49.
- Diamond S.A., Mount, D.R., Burkhard L.P., Ankley G.T., Makynen E.A. and Leonard E.N.** 2000.Effect of irradiance spectra on the photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environment. toxicology*. 1389-1396.
- Diggles B.K.**2001. A mycosis of juvenile spiny rock lobster, *Jasus edwardsii* (Hutton,1875) caused by *Haliphthoros* sp., and possible methods of chemical control. *Journal of Fish Diseases*. 24: 99–110.

- Effler SW Litten S, Field SD, Tong-Ngork T, Hale F** .1980.Whole lake response to low level copper sulfate treatment. *Water Resistant*.14:1489–1499.
- Fajer-Ávilla E.J., Abdo-de la Parra, I., Aguilar-arate, G., Contreras-Arce, R., Zaldívar-Ramírez, J., Betancourt-Lozano, M.**2004.Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*. 223(1): 41-50.
- Fan A., Howd, R., Davis, B.** 1995. Risk assessment of environmental chemicals. *Annu Review Pharmacology Toxicology*. 35:341-348.
- Fernández-Alba A.R., Hernando, M.D., Piedra,L., Chisti,Y.** 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifoulind biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta*. 456: 303-312.
- Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, Chisti. L.** 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta*. 456: 303–312.
- Francisco B. Z.** Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados .Univesidad Autonoma de Yucatán, Yucatán México.
- Gaete H. y Paredes K.** 1996. Toxicidad de mezclas de contaminates químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 12(1): 23-28.
- Gaete H., Chávez, C.** 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). *Asociación Ibérica de Limnología*. 27 (1): 1-10.

- Gaete H., Larrain, A., BaySchmith, E., Baeza, J., Rodríguez J.** 2000. Ecotoxicological assessment of two pulp mills effluents, locate in the Biobío river basin (Chile, Central). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63:797–804.
- García S. F., De Lima, B. C., Romagueira, B. L., Tie, O.E., Lucia, K. A., Tadeu, R. F.** 2010. The combined effect of copper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Ecotoxicology* 19:963–976.
- García-Rodríguez A.** 2009. Determinación de metales pesados en agua, sedimento y camarón rosado *Farfantepenaeus notialis* del Golfo de Ana María. Universidad de la Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos. Tesis de Licenciatura.
- Gledhill M., Nimmo, M., Hill, S.J., Brown, M.T.** 1997. The toxicity of copper (II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. *Journal. Phycology*. 33
- Gómez J.J., Hernández, V.O., Iglesias, B.S.** 2004. The sea and its contaminants. *Journal of Maritime Research*. 1(2), 85-93.
- Guida M., Inglese, M., Meriç S.** 2008. A multi-battery toxicity investigation on fungicides *Desalination* 226: 262–270.
- Hameed A.S.S., Balasubramanian, G.** 2000. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia nauplii* and efficacy of formaldehyde to control bacteria load. *Aquaculture*. 183, 195–205.

- Hameed A.S.S., Balasubramanian, G.** 2000. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia nauplii* and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture*. 183: 195–205.
- Hamers T., Smit, M.G.D., Murk, A.J., Koeman, J.H.** 2001. Biological and chemical analysis of the toxic potency of pesticides in rainwater. *Chemosphere* 45:609–624.
- Haughey M.A., Anderson, M.A., Whitney, R.D., Taylor, W.D., Losse, R.F.** 2000. Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO_2 treatment. *Water Research*. 34(13):3440-3452.
- Hewlett P.y Plackett S.** 1969. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs. Non-interactive action. *Biometrika*. 15:591-610.
- IARC** (International Agency for Research on Cancer). 1995. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 62 - Wood dust and formaldehyde. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- IPCS** (International Programme on Chemical Safety) .1989. Environmental Health Criteria 89: Formaldehyde. Geneva, World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm>. Consultado en Noviembre 2011.
- IPCS** (International Programme on Chemical Safety). 2005. Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment. Geneva, World Health Organization.

- Jackson B. P., Lasier, P. J., Millar, W. P., Winger, P.W.** 2000. Effects of Calcium, Magnesium, and Sodium on Alleviating Cadmium Toxicity to *Hyaella azteca*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.64: 279-286.
- Jan Baas Y Bas Kooijman.** 2010. Chemical contamination and the ecological quality of surface water. *Environmental Pollution*. 158:1603–1607.
- Jaramillo-Juárez F., Rincón-Sánchez, A.R., Posadas, F.A.** 2006. Toxicología Básica, primera ed. Textos Universitarios, Aguascalientes México.
- Jensen M. A., Ritar, A. J., Burke, C., Ward, L. R.** 2011. Seawater ozonation and formalin disinfection for the larval culture of eastern rock lobster, *Jasus (Sagmariasus) verreauxi*, phyllosoma. *Aquaculture* 318: 213–222.
- Jiménez J.G., Gelabert, R., Brito R.** 2006. Efectos tóxicos del níquel y el zinc en *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa México, 65-74.
- Jiménez-Cisneros., B.E.** 2005. Contaminación Ambiental en México. Segunda edición. ed. Limusa, México, D.F.
- Jo H.J., Kijong, C.S., Jung, J.** 2010. Combined effects of water quality parameter on mixture toxicity of copper and chromium toward *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 81:1311-1307
- Karlsson J. y Eklund, B.** 2004. New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Marine Pollution Bulletin*. 49:456-64.

KEMI. Swedish Chemicals Agency. 2010.
http://www.kemi.se/Documents/Publikationer/Trycksaker/PM/PM3_10.pdf.
Consultado en Noviembre 2011.

Khengarot B.S., y Rathore, R. 2003. Effects of copper on respiration, reproduction, and some biochemical parameters of water flea *Daphnia magna* Straus. *Bulletin Environmental Contamination. Toxicology*.70: 112-117.

Kim B., Nevitt, T., Dennis., Thiele., J. 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*.4(3):176-185.

Kokkali V., Katramados, I., Newman, J.D. 2011. Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemia salina* nauplii. *Biosensor*. 1:36-45.

Koutsafits A., Aoyama, I. 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia Salina*. *Science of the total Environment*. 387: 166-174.

Kungolos A., Hadjispyrou, S., Samaras, P., Petala ,M., Tsiridis, V., Aravossis, K., Sakellaropoulos, G. P. 2001. Proceedings of the 7th International Conference on Environmental Science and Technology, pp. 499 – 505.

Kungolos A., Samaras, P., Koutseris, E. 2003. Using bioassays for testing seawater quality in Greece. *Journal of Environmental Science and Health. Part A*, vol. 38, no3, pp. 533-544.

Küpper H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F.C., Prasil, O. 2002. Heavy-metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal . Phycology*. 38, 429–441.

- Lavens P.; Sorgeloos, P.** 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. 361. 295 pp.
- MacCarty L.S., y Borgert, C.J.** 2006. Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 45:119-143.
- Markich S.J., Brown, P., Battey, G.E., Apte, S.C. Stauber, J.L.** 2001. Incorporating metal speciation and bioavailability into water quality guidelines for protecting aquatic ecosystems. *Australasian Journal of Ecotoxicology*. 7: 109-122.
- Marking L.L., Rach, J.J., Schreier, T.M.** 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Program. Fish Culture*. 56, 225–231.
- Martínez G., Senior, W., Márquez, A.** 2006. Especiación de metales pesados en la fracción disuelta de las aguas superficiales de la cuenca baja y la pluma del río manzanares, estado sucre. *Ciencias Marinas*. 32: 239-257.
- Martins J., Soares, M.L., Saker, M.L., OlivaTelesa, L., Vasconcelos, V M.** 2007. Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 417–422.
- Mathews C.K., Van Holde K.** 1998 Bioquímica. Segunda Ed. Madrid: McGraw-Hill.España
- Mazón A.F., Fernández, M.N.** 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Phröcilodontidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63:797–804.

- McCooloe D.M., Baer, N.K., Christie, A. E.** 2011. Histaminergic signaling in the central nervous system of *Daphnia* and role for it in the control of phototactic behavior. *The Journal of Experimental Biology*. 214:1773- 1782.
- Mosqueira-Pérez. S.** 2009. Química ambiental. Sexta reimpresión, ed. Patria, México D.F
- Naddem R., Hanif, M.S., Riaz, M. Azhar, A.A., Iqbal, T., Ansari, T.M.** 2010. Kinetic and equilibrium modeling of CU(II) and Ni(II) sorption onto physically pretreated *Rosa centifolia* distillation waste biomass. *African Journal of Biotechnology*. 9(53): 9051-9062.
- Nielsen H.D., Brownlee, C., Coelho, S.M., Brown, M.T.** 2003. Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytology*. 160, 157–165.
- OECD** (Organization for Economic Cooperation and Development). 2002. SIDS (Screening Information Data Set) Initial Assessment Report for 14th SIAM (Paris, France, March 2002): Formaldehyde. Germany.
- Otitolaju, A.A.** 2002 .Evaluation of the joint action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus var radula*(L). *Ecotoxicology Environmental Safty*.53:404-415.
- Páes-Osuna, F.**2005. Fuentes de Metales en la zona costera marina, p.329-342. In A.V. Botello, J. Rendón-Von Osten, G. Gold-Bouchot, Agraz-Hernández, C, (Eds). Golfo de México Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias., 2ª. Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad

Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, 696p

Páez-Osuna, F.1996a. Efectos de los metales. En: Vázquez-Botello A, Rojas-Galaviz JL, Benítez JA,Zárate-Lomeli D (eds) Golfo de México, Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica; (5) 666 pp.

Páez-Osuna, F.1996b. Fuente de los metales en la zona costera marina. En: Vázquez-Botello A, Rojas-Galaviz JL, Benítez JA,Zárate-Lomeli D (eds) Golfo de México, Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica; (5) 666 pp.

Pavlaki M.D., Pereira, R., Loureiro,S., Amadeu. M.V.M .2010. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 99–110.

PBS Public Broadcasting Service . 2001

Persoone G. y Sorgeloost, P.1980. The Brine *Shrimp Artemia* general aspects of ecology and biogeography of Artemia G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers Universa Press Wetteren, Vol. 3, Belgium pp. 3-24.

Peterson C. J., Tsao, R., Egglar, A. L., Coats J. R. 2000. Insecticidal Activity of Cyanohydrin and Monoterpenoid Compounds. *Molecule*. 5, 648-654.

Pino Pérez y Jorge Lazo. 2010. Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 22(1):34-43.

- Ponce-Vélez G. y Vázquez-Botello A. 1991.** Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, de Campeche. *Hidrobiología*. 1(2): 1-10.
- Rai L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D.**1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biology*. Review. 56, 99–151
- Ramírez Romero Patricia y Cantú Mendoza Ania 2008,** Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. experiencia en México, primera ed. Impresora y Encuadernadora Progreso S.A. de C.V. México,D.F.
- Ruther W., Graul, E., Heinrich, W. 1974.** Preliminary results on the action of cosmic heavy ions on the development of eggs of *Artemia salina.*, *Life Sciencies and Space Reserch* 12:69-74.
- Schwarzenbach R.P., Escher B.I., Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, Von Gunten U, Wehrli B.**2006.The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313:1072–1077.
- Schwarzenbach R.P., Escher B.I., Fenner K., Hofstetter, T.B, Johnson C.A, Von Gunten U, Wehrli B.**2006.The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*. 313:1072–1077.
- Semarnat 2007** ¿Y el medio ambiente? Problemas en México y el mundo. Semarnat. México.
- Serezli R., Akhan, S., Delihasan-Sonay,F. 2011.** Acute effects of copper and lead on some blood parameters on Coruh trout (*Salmo coruhensis*). *African Journal of Biotechnology*. 10 (16): 3204-3209.

- Silva E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A.** 2002. Something from “nothing” eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental Science and Technology* 36, 1751–1756.
- Silva J., Iannaccone J., Cifuentes A., Troncoso L., BaySchmith E. y Larraín A.** 2001. Assessment of sensitivity to pentachlorophenol (PCP) in 18 aquatic species, using acute and chronic ecotoxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*. 4: 1017.
- Sponza., D.** 2003. Application of toxicity tests into discharges of the pulp and paper industry in Turkey. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 7486.
- Sullivan JB, Krieger GR.** 2001 *Environmental Sciences: Pollutant Fate and Transport in the Environment*. En: Sullivan JB, Krieger GR, editors. *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins: 6-30.
- Tao S., Liang T., Cao J, Dawson R, Liu C.F.** 1999. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 44:190–195.
- Vighi M., Altenburger, R., Arrhenius, A., Backhaus, T., Bödeker, W., Blanck, H., Consolaro, F., Faust M., Finizio, A.** 2003. Water quality objectives for mixture problems and perspectives. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 54(2):139-5.
- Zhou Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G.** 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Science Direct*. 606:135-150.

