

21  
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

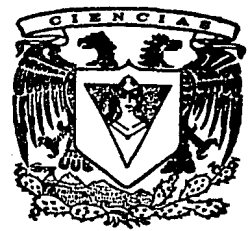
TOXICIDAD AGUDA PRODUCIDA POR LOS INGREDIENTES  
ACTIVOS *DBS*, *ABLS*, *MIXTO* Y POR LOS  
DETERGENTES COMERCIALES QUE LOS CONTIENEN,  
EN LA CARPA *Cyprinus carpio*  
(LINNEO 1758)

# T E S I S

Que para obtener el Título de  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

p r e s e n t a

Elizabeth Nallely Cabrera González



México, D. F.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## C O N T E N I D O

1.0	INTRODUCCION	1
1.1	<i>Antecedentes</i>	7
1.2	<i>Objetivos</i>	11
2.0	MATERIALES Y METODOS	12
2.1	<i>Ingredientes Activos</i>	15
2.2	<i>Detergentes Formulados Comerciales</i>	15
2.3	<i>Bioensayo Exploratorio</i>	16
2.4	<i>Bioensayo Final o Formal</i>	18
2.5	<i>Parámetros de Toxicidad</i>	18
2.6	<i>Categorización de los Índices de toxicidad</i>	23
2.7	<i>Determinación de Parámetros Fisicoquímicos</i>	24
2.8	<i>Estudios Histológicos</i>	25
3.0	RESULTADOS	28
3.1	<i>Bioensayos de Toxicidad</i>	28
3.2	<i>Estudios Histológicos</i>	50
4.0	DISCUSION DE RESULTADOS	70
5.0	CONCLUSIONES	100
6.0	BIBLIOGRAFIA	104

## 1.0 INTRODUCCION

En las últimas décadas el problema de la contaminación del agua se ha ido agravando debido al extenso uso de preparados detergentes sintéticos para fines domésticos (León, 1973) industriales, agrícolas y otros (Mohnot, 1975; Cabridenc, 1979).

Con el nombre de detergente se conoce a aquella formulación capaz de eliminar manchas y suciedad poniéndolas en solución o dispersión (Cabridenc, op cit.). Esta formulación contiene compuestos activos llamados surfactantes y compuestos complementarios que son los coadyuvantes, reforzadores, secuestradores, cargas y aditivos.

En general, cualquier molécula de surfactante posee una cadena polar alifática que es hidrofílica y una parte aromática que es hidrofóbica; a esta dualidad se deben las propiedades de los de

tergentes.

Dependiendo de la naturaleza del grupo polar hidrofílico, se conocen 3 tipos de surfactantes: aniónicos y catiónicos (incluidos los anfóteros) y no iónicos.

Los Surfactantes Aniónicos representan a la mayoría de los productos utilizados para el lavado; entre ellos se encuentran los de origen petrolífero: *alquilsulfatos*, *alquilsulfonatos* y *alquilarilsulfonatos* de cadena lineal o ramificada. Poseen uno o varios grupos funcionales que se disocian en solución acuosa suministrando iones negativos.

Los Surfactantes Catiónicos se emplean sólo en aplicaciones especiales; son sales de amonio que poseen uno o varios grupos funcionales que dan en solución acuosa iones cargados positivamente.

Los Surfactantes Anfóteros poseen uno o varios grupos funcionales y se ionizan dependiendo de las condiciones del medio, confiriendo así al compuesto el carácter catiónico o aniónico.

Los Surfactantes no iónicos, no se ionizan en solución. Su empleo está reservado a ciertas aplicaciones como la industria textil.

Debido a que los detergentes son arrojados a los cuerpos de agua, modifican las propiedades físicas y químicas de la misma, rompen el equilibrio ecológico y alteran los procesos naturales de depuración (Koskova et al, 1979). Un daño particular de los detergentes es que son tóxicos para los organismos acuáticos aún en bajas concentraciones y particularmente en el caso de exposiciones crónicas; además, pueden potenciar los efectos nocivos de otros contaminantes presentes en aguas naturales tales como el petróleo y sus destilados, anilinas, pesticidas, etc. (Cabridenc, op cit.). Asimismo, son la fuente primaria de contaminación por fosfatos (Koskova et al, op cit.).

Es sabido el poder contaminante de los detergentes aniónicos como el ABS (*alquil bencen sulfonato*) y DBS (*dodecil bencen sulfonato de sodio*) entre otros, y de sus efectos tóxicos y letales a la fauna acuática (Cabridenc, op cit.; Martínez, 1971; Banerji, 1970; Mohnot, 1975; Hokanson, 1971; Abel, 1974; Bromage, 1976; Marchetti, 1964; Eisler, 1972; Brown, 1978; Marchetti, 1965). Esto ha influido para que algunos países cambien de estas formulaciones que no son biodegradables, a compuestos susceptibles de ser transformados por microorganismos a sustancias más simples, tal es el caso del LAS (*sulfonato de alquilo lineal*) también conocido como *lauril sulfonato de sodio* (Cabridenc, op cit.; Martínez, op cit.; López, 1973). Sin embargo, el efecto no tóxico de este último compuesto, así como de otros tipos de detergentes biodegradables, está sujeto a discusión

por parte de los especialistas en toxicidad de detergentes (Abel, 1974; Abel et al, 1975).

El primer jabón artificial o detergente fue el *di-isopropil naftalen sulfonato*, desarrollado en 1916 por el alemán Fritz Gunther como respuesta a la dificultad para obtener grasas durante la primera guerra mundial (Waite, 1984)..

En 1932 se vendió en Estados Unidos el primer detergente de uso doméstico, el cual fue elaborado en respuesta a la necesidad de substituir el jabón en aquéllas áreas del país con aguas duras (Waite, op cit.).

Los detergentes sintéticos fueron introducidos por primera vez al mercado mundial en el año de 1949 y rápidamente alcanzaron un uso generalizado, sobretudo en el ambiente doméstico (León, op cit.).

Actualmente en México, la industria fabrica detergentes con una base activa de DBS, adicionando algunos compuestos como fosfatos, sulfato de sodio, colorantes, perfumes y blanqueadores entre otros. Petróleos Mexicanos es el único productor de DBS, el cual se elabora en las Refinerías de Azcapotzalco y ciudad Madero, Tamaulipas (Tabla I), pero la problemática del uso creciente de detergentes propició que se llevara a cabo una prueba industrial en la planta "MU" de la refinería de Cd. Ma-

TABLA I. CONSUMO APARENTE DE ØBS (TON/AÑO)

AÑO	TONELADAS
1980	115 039
1981	118 121
1982	141 521
1983	135 134
1984	125 767
1985 <sup>+</sup>	78 613
1986	103 405

Fuente: Subdirección de Estudios Económicos y Planeación, Instituto Mexicano del Petróleo. (1986)

+ Valor estimado



dero, Tamps., con el propósito de producir ABLs (*Alquil bencen lineal sulfonato de sodio*) para sustituir al DDB (*dodecil benceno*) que al sulfonarse y neutralizarse produce la base para detergente, el DBS, de baja biodegradación que es de producción regular.

Para ello era necesario realizar una serie de estudios de biodegradación, factibilidad económica, toxicidad etc., que permitieran establecer un criterio acertado para favorecer o no la sustitución de detergentes no biodegradables a biodegradables en nuestro país.

Por tanto, en el presente trabajo se realizó la comparación de la toxicidad del detergente formulado a partir del ABLs, contra el detergente correspondiente al DBS de producción regular, así como la de sus respectivas bases activas, en la carpa *Cyprinus carpio*.

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) y en el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Dependiendo de los resultados del presente estudio y de una serie de trabajos más sobre estos detergentes, en el ya mencionado Instituto, se evaluará la conveniencia de cambiar la produc

ción del ABLS para producirlo industrialmente como base de los detergentes comerciales que se fabrican en México.

### 1.1 Antecedentes

La literatura que trata de los efectos de detergentes en peces se basa principalmente en estudios efectuados en el extranjero, sobretodo en Estados Unidos de Norteamérica, Inglaterra, Alemania, Francia y algunos en Italia.

La información que hay respecto a la toxicidad de los detergentes no biodegradables data de los años 1957 a 1960 y para el ABLS de 1962 a 1964, ya que en los Estados Unidos de Norteamérica el cambio de proceso de detergentes no biodegradables a biodegradables tuvo lugar en 1965 y en Alemania e Inglaterra en 1966 (López, op cit.).

En años anteriores en nuestro país se usaba como base para detergentes el ABS, actualmente se usa el DBS, ambos detergentes aniónicos parecidos estructuralmente y no biodegradables, por este motivo, los estudios realizados en México sobre este tema se han basado en las comparaciones de toxicidad del ABS con respecto al ABLS (Alquil bencen lineal sulfonato) así como con otras bases para detergentes del tipo AOS (Alquil olefín sulfonato) en diferentes especies de peces (*Tilapia melanopleura*, *Salmo gairdneri*, *Cyprinus carpio* y *Ctenopharyngodon idella*).

En el Instituto de Ingeniería de la UNAM se realizaron estudios acerca de "Los efectos de los detergentes sobre los peces y plantas", encomendados por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) durante el período de 1973 a 1979. A continuación se citan los resultados obtenidos, las bases para detergentes usadas, así como las especies seleccionadas.

Los estudios realizados por López et al, 1973, usando ABS, LAS y sus detergentes comerciales, mostraron que éstos últimos no producen efectos mortales en *C. carpio* en las concentraciones de 1 a 22 mg/l, sin embargo, se obtuvieron valores de  $LT_m$  (Límite de Tolerancia medio) a las 96 horas para las bases activas de 18 mg/l para ABS y de 5 mg/l para ABL, lo que indica que esta última base es mucho más tóxica.

En 1974, López et al, estudiaron los efectos de algunos detergentes en *C. carpio*, *Tilapia melanopleura* y *Salmo gairdneri* encontrándose los siguientes  $LT_m$ : (Tabla II).

En 1978, Flores et al, realizaron estudios con los detergentes anteriores en carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella*, observándose las siguientes  $LT_m$  a 96 hr: (Tabla III).

Otros ensayos sobre esperma y huevecillos de charal demuestran que 1 y 2 mg/l de detergentes de los tipos mencionados anteriormente, reducen la movilidad del esperma y la fecundación se ve

TABLA II. RESULTADOS PARA EL  $LT_m$  OBTENIDOS POR LOPEZ ET AL., 1974, INSTITUTO DE INGENIERIA, UNAM

SURFACTANTE	ESPECIES PROBADAS	RESULTADOS (mg/l)
AOS	<i>Cyprinus carpio</i>	LTm - 24 hr 3.2
AOS	<i>Tilapia melanopleura</i>	LTm - 96 hr 2.0
ABS	<i>T. melanopleura</i>	LTm - 96 hr 37.0
ABL	<i>T. melanopleura</i>	LTm - 96 hr 23.0
ABS	<i>Salmo gairdneri</i>	LTm - 96 hr 5.5
ABL	<i>S. gairdneri</i>	LTm - 96 hr 1.0
ABS comercial con enzimas	<i>C. carpio</i>	LTm - 24 hr 12.5
ABL comercial con enzimas	<i>C. carpio</i>	LTm - 24 hr 5.4
ABS comercial	<i>T. melanopleura</i>	LTm - 96 hr 23.0
ABL comercial	<i>T. melanopleura</i>	LTm - 96 hr 4.6
ABS comercial	<i>S. gairdneri</i>	LTm - 96 hr 7.0
ABL comercial	<i>S. gairdneri</i>	LTm - 96 hr 5.5

TABLA III. RESULTADOS PARA EL  $LT_m$  OBTENIDOS POR FLORES ET AL., 1978. INSTITUTO DE INGENIERIA, UNAM.

SURFACTANTE	$LT_m-96$ hr (mg/l)
ABS	5.4
ABS comercial	10.2
ABS comercial con enzimas	15.6
LAS	10.2
LAS comercial	5.2
LAS comercial con enzimas	10.2

afectada en un 20 a 30% con las mismas concentraciones. En con centraciones de 7 a 10 mg/l se observa una aceleración en la eclosión de los huevos (Flores et al, op cit.).

Estudios letales con alevines de carpa herbívora indican que es la concentración y no el tipo de detergente lo que afecta el desarrollo normal de estos organismos (Flores et al, op cit.).

En México se encontró que no existen estudios histopatológicos formales con respecto a la toxicidad de los detergentes en peces.

En un sólo estudio (López, 1979) se muestran únicamente fotogra fías de cortes histológicos de branquias, sin descripción de

los daños causados por los detergnetes y sin mencionar la técnica de tinción utilizada.

## 1.2 *Objetivos*

El presente trabajo tiene como objetivos:

- Determinar la toxicidad aguda de los ingredientes activos DBS, ABLs, MIXTO (82.2% DBS + 17.3% ABLs) y de los detergentes comerciales fabricados a partir de ellos, en la carpa *C. carpio*.
- Observar el daño causado por los detergentes formulados comerciales a nivel tisular en branquias, hígado y riñón, por ser estos de los órganos más susceptibles de resultar afectados.

## 2.0 MATERIALES Y METODOS

El método usado para evaluar la toxicidad de los detergentes y de sus bases activas fue el de Bioensayo a corto plazo, debido a que es un método cuantitativo conocido y estandarizado que permite evaluar la toxicidad de cualquier producto, es decir, permite determinar un valor que refleje el efecto de un producto con una respuesta observable y cuantificable en un cierto periodo de tiempo (Sprague, 1970 y 1973; Stephan and Mount, 1973; Cairns, op cit.; APHA-AWWA-WPCF, 1982; Comité de Métodos para Pruebas de Toxicidad... EPA, 1974).

Es común utilizar peces en este tipo de pruebas de toxicidad, por ser organismos individualmente sensibles que se encuentran permanentemente expuestos a desechos de efluentes, contaminantes disueltos o particulados, etc., con una capacidad mínima para eliminarlos (Erichsen, 1964; APHA-AWWA-WPCF, op cit.).

Los criterios usados en la selección de *C. carpio* para estudiar el efecto de los detergentes y de las bases activas fueron los siguientes:

Es una de las especies sugeridas para hacer estudios de toxicidad (APHA-AWWA-WPCF, op cit.).

Amplia distribución y consumo en nuestro país.

Fácil manejo, biotecnología de cultivo desarrollada, gran adaptabilidad a condiciones ambientales, aceptabilidad de alimento especial etc. (López, op cit.; Gutiérrez, 1980; Secretaría de Pesca, 1982).

Los peces *C. carpio* utilizados se encontraban en estado juvenil (de 3 a 7 cms de longitud) y provinieron del Centro Piscícola Tezontepec de Aldama, Hgo., los cuales fueron transportados al laboratorio en bolsas de plástico de 16 x 30 cms con previa inyección de oxígeno.

La aclimatación de los peces se llevó a cabo en peceras de 20 l de capacidad, a las que se agregó agua de manantial del Centro Piscícola transportada en tres recipientes de polietileno con capacidad aproximada de 200 l cada uno. La aclimatación se realizó en un periodo de 10 días, antes de la iniciación de los bioensayos, durante el cual los peces fueron alimentados con ali



mento comercial en escamas marca "Tetra Pérez".

El porcentaje de mortalidad de los peces durante la aclimatación fue menor al 10%, porcentaje que se encuentra por debajo del límite aceptable para un lote de peces sujetos a estudios de toxicidad (APHA-AWWA-WPCF, op cit.; EPA, op cit.).

Una vez terminado el periodo de aclimatación, se procedió a efectuar los bioensayos aplicando el método de bioensayo sugerido por Cubillas, 1982; APHA-AWWA-WPCF, op cit; Sprague, 1973 (ASTM); Stephan and Mount, 1973 (ASTM); Peltier, 1978; y Comité de Métodos para Pruebas de Toxicidad con Organismos Acuáticos (EPA), 1975.

El procedimiento consiste de dos pruebas conocidas como bioensayo exploratorio (0 a 24 hr de duración) y bioensayo final o formal (0 a 96 hr de duración), en las cuales los organismos con los que se va a experimentar, en este caso los peces, se sujetan a una serie de diferentes concentraciones de un tóxico conocido o probable, en este caso el detergente.

Las bases o los ingredientes activos y los detergentes formulados comerciales usados en este estudio fueron los siguientes:

## 2.1 Ingredientes activos

Ingrediente activo *Alquil Bencen Lineal Sulfonato de Sodio* (ABLS). Se obtuvo a partir del *Alquil bencen lineal ABL*, de la planta "MU" de Ciudad Madero Tamaulipas de Pemex, que al sulfonarse y neutralizarse a escala laboratorio se obtuvo el ABLS con pureza de 40.32%.<sup>+</sup>

Ingrediente activo *Dodecil Bencen Sulfonato de Sodio* (DBS). Se obtuvo a partir del *dodecil bencen* (DDB) de producción regular, con pureza del 39.48%.<sup>+</sup>

Ingrediente activo mixto (17.3% ABLS + 82.2% DBS)  
Origen de planta industrial con pureza del 57.67%.<sup>+</sup>

## 2.2 Detergentes formulados comerciales

Detergente Formulado ABLS<sub>F</sub>

Como no fue posible obtener esta muestra a escala industrial, el ABL se sulfonó y neutralizó a escala laboratorio para obten

+ Material e Información proporcionados por la División de Procesos Petroquímicos de la Subdirección de Tecnología de Refinación y Petroquímica del Instituto Mexicano del Petróleo.

ner el ABLs y con la adición de otros compuestos que se mencionan en la Tabla IV se preparó el detergente formulado ABLs<sub>F</sub> para lavado de ropa.

Detergente formulado FAB LIMON DBS<sub>F</sub>

Se obtuvo a escala industrial a partir del ingrediente activo DBS, adicionando otros compuestos (Tabla IV) que dieron como resultado el detergente formulado Fab Limón DBS<sub>F</sub> para lavado de ropa.

Detergente formulado Mixto FAB LIMON MIXTO<sub>F</sub>

Se obtuvo añadiendo 17.3% del ABLs y 82.2% del DBS y con la adición de otros compuestos señalados en la Tabla IV se generó industrialmente el detergente formulado Fab Limón Mixto<sub>F</sub> para lavado de ropa.

### 2.3 Bioensayo exploratorio

En el bioensayo exploratorio estático (0-24 hr) se evaluaron las concentraciones de 1,5,10,100,200 y 500 mg/l para cada tipo de base activa y de detergente formulado comercial de manera independiente, con un testigo y una prueba original de tres peces para cada concentración, repartidos individualmente en peceras de 8 l de capacidad llevadas a un volumen de 5.5 l con

TABLA IV. DETERGENTES FORMULADOS

COMPUESTOS	ABLS <sub>F</sub>	DBS <sub>F</sub> (porcentaje)	MIXTO <sub>F</sub>
Ingrediente activo	17.1	21.2	19.6
Sulfato de sodio	45.9	41.8	43.4
Tripolifosfato de sodio	20.5	20.5	20.5
Silicato de sodio	7.5	7.5	7.5
Perfume y color	1.0	1.0	1.0
Humedad	8.0	8.0	8.0

aeración artificial durante todo el experimento.

A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos exploratorios se procedió a determinar las concentraciones a utilizar en los bioensayos finales o formales, para cada tipo de base activa así como para los detergentes comerciales.

#### 2.4 Bioensayo final o formal

El bioensayo final estático a corto plazo (0-96 hr) se realizó con las concentraciones obtenidas a partir del bioensayo exploratorio que se muestran en la Tabla V, utilizando una prueba original, una réplica y un testigo con cinco peces para cada prueba, repartidos individualmente en peceras de 8 l de capacidad, llevadas a un volumen de 5.5 l con aeración artificial. (Lamina 1)

#### 2.5 Parámetros de toxicidad

Como parámetros de toxicidad se consideraron los siguientes:

Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ). Concentración en la cual el 50% de los organismos expuestos al tóxico mueren en un tiempo específico de observación. Por ejemplo  $CL_{50} - 96 \text{ hr.}$

Este parámetro de toxicidad fue evaluado únicamente para los detergentes formulados comerciales.

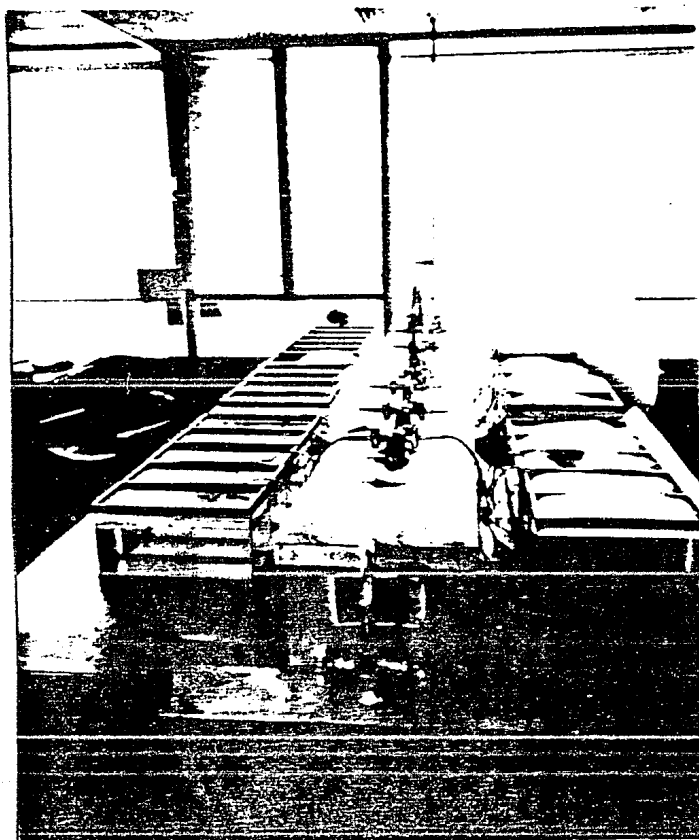


Lámina 1. Bioensayos Finales.

TABLA V. CONCENTRACIONES DE LOS DETERGENTES COMERCIALES USADAS EN LOS BIOENSAYOS FINALES O FORMALES

ABLS <sub>F</sub> (mg/ℓ)	DBS <sub>F</sub> (mg/ℓ)	MIXTO <sub>F</sub> (mg/ℓ)
50	75	110
75	95	130
125	115	150
150	135	170
175	155	190

Límite de Tolerancia Medio ( $LT_m$ ). Tiempo específico de sobrevivencia del 50% de la población de los organismos sometidos a prueba, en una concentración previamente conocida del contaminante.

Este parámetro de toxicidad fue evaluado únicamente para los ingredientes activos con las siguientes concentraciones:

ABLS - 16.86 mg/ℓ

DES - 22.31 mg/ℓ

MIXTO - 28.19 mg/ℓ

Las concentraciones usadas para determinar el  $LT_m$  fueron calculadas a partir de la  $CL_{50} - 96$  hr. de cada uno de los detergentes usados dependiendo del contenido y pureza de los ingredientes activos.

Para conocer la cantidad del ingrediente activo puro, contenido en la  $CL_{50} - 96$  hr. de los detergentes formulados se hizo lo siguiente:

$$x = \frac{a \cdot b}{100}$$

donde:

x = cantidad del ingrediente activo puro en mg/l

a =  $CL_{50} - 96$  hr de cada uno de los detergentes formulados



$b$  = porcentaje del ingrediente activo contenido en cada uno de los detergentes formulados comerciales sometidos a prueba.

Para calcular la cantidad de ingrediente activo requerido para realizar la determinación del  $LT_m$  se realizó lo siguiente:

$$y = \frac{x \cdot 100}{p}$$

donde:

$y$  = cantidad de ingrediente activo requerido

$x$  = cantidad de ingrediente activo puro

$p$  = pureza del ingrediente activo en porcentaje.

Curvas asintóticas de toxicidad. En ellas se muestran las relaciones tóxicas de la concentración letal del producto nocivo con respecto al tiempo del experimento.

Para la determinación de los parámetros de toxicidad mencionados se siguieron los siguientes pasos:

$CL_{50}$  concentración letal media:

Se graficó en papel semilog la concentración del detergente formulado (escala logarítmica) contra porcentaje de sobrevivientes (escala milimétrica) para los diferentes tiempos de exposición de los peces (Cubillas, op cit.).

Se realizó un ajuste de la curva usando regresión lineal. Se obtuvo el logaritmo en base 10 de la concentración del detergente para poder obtener una regresión lineal.

Se hizo una interpolación para conocer la concentración letal con un 50% de sobrevivientes y posteriormente se obtuvo el antilogaritmo de este valor, teniendo como resultado la  $CL_{50}$ .

Los puntos anteriores se elaboraron tanto para el experimento original como para el experimento réplica. Se obtuvo el promedio de ambos resultados, siendo éste el que se observa en las Tablas de resultados.

Se calculó el límite de confianza al 95% para la  $CL_{50}$ .

Límite de Tolerancia Medio  $LT_m$

Se graficó el porcentaje de mortalidad (escala probabilística) contra el tiempo de duración del bioensayo en horas (escala logarítmica). El valor del  $LT_m$  se obtuvo interpolando el 50% de mortalidad con el tiempo correspondiente, según lo indica el método gráfico.

## Curvas asintóticas de toxicidad

Para obtener las curvas asintóticas de toxicidad se graficó en papel logarítmico la duración del experimento (horas o días) contra las concentraciones letales medias de cada uno de los detergentes formulados comerciales.

### 2.6 Categorización de los índices de toxicidad

La calificación de los índices de toxicidad se determinó de acuerdo a la publicación técnica especial de la ASTM (Cairns, op cit.) en los siguientes rangos:

"Parcialmente no tóxicos"	con un umbral agudo letal arriba de 10 000 mg/l o aproximadamente 1%
"Ligeramente tóxico"	con un umbral de 1000 a 10 000 mg/l
"Moderadamente tóxico"	con un umbral de 100 a 1000 mg/l
"Tóxico"	con un umbral de 1 a 100 mg/l
"Muy tóxico"	con un umbral inferior a 1 mg/l

## 2.7 Determinación de parámetros fisicoquímicos

Con objeto de cuantificar las características fisicoquímicas del agua utilizada durante los bicensayos, se realizaron mediciones de los siguientes parámetros: temperatura, conductividad, salinidad, oxígeno disuelto, potencial hidrógeno y dureza.

La temperatura se determinó empleando termómetro de mercurio de -10 a 50°C marca Brand.

La conductividad se midió con un conductímetro marca Bridge modelo 31.

La salinidad se obtuvo por el método indirecto de Richards, 1977.

El oxígeno disuelto se determinó mediante el método Winkler o método Yodométrico modificado con azida de sodio según APHA. También se determinó mediante métodos electrométricos utilizando un Oxímetro New Brunswick Scientific.

El pH se midió mediante un potenciómetro Corning modelo 125.

Por último, la dureza se obtuvo siguiendo la metodología indicada por APHA.

Estas mediciones se realizaron al inicio y final de cada bioensayo.

### 2.8 Estudios histológicos

Estos estudios se realizaron como parte complementaria a los bioensayos, con la finalidad de observar el daño causado por los detergentes a nivel tisular en branquias, hígado y riñón, seleccionándose estos órganos por ser de los más susceptibles a ser dañados por tóxicos, especialmente las branquias debido a su contacto directo con los detergentes.

Se realizó la disección de los peces sometidos a las concentraciones máxima y mínima utilizadas en los bioensayos formales para cada detergente (Tabla V). Esta se efectuó empleando un microscopio estereoscópico Wild modelo M5 inmediatamente después de su muerte.

Además, se realizó la disección de peces testigo con el objeto de obtener los mismos órganos necesarios para la histología normal.

La histología (normal y patológica) se llevó a cabo tomando 3 peces de cada concentración y 3 peces testigo.

Para las branquias en particular, se tomaron 2 láminas branquia

les (una de cada lado) siendo éstas las terceras en posición de afuera hacia adentro de la cavidad branquial.

Los órganos fueron fijados en formol al 10%, manteniéndose un mínimo de 24 hr. Posteriormente se lavaron con agua corriente durante 12 hr. mínimo, para continuar con la técnica de inclusión en parafina (Estrada et al, 1982).

La parafina empleada tuvo un punto de fusión de 56 a 58°C y su presentación fue en escamas. Se obtuvieron cortes con un grosor de 7 $\mu$  en un microtomo rotatorio American Optical.

La técnica de coloración usada fue la de Hematoxilina-Eosina (hematoxilina de Harris-eosina alcohólica) según Estrada, et al, op cit.

Esta es una técnica sencilla que permite resaltar las características generales de las células en un tejido, además de ser una de las más utilizadas en estudios histológicos y en trabajos comparativos de toxicidad con detergentes (Eisler, op cit.)

Los tiempos de tinción empleados fueron: (minutos)

	Hematoxilina	-----	Eosina
Branquias	3		1.00
Hígado	3		0.50
Riñón	3		0.45

Una vez que se obtuvieron las preparaciones correspondientes, se continuó con el estudio histológico utilizando un microscopio óptico American Optical modelo microstar, además de seleccionar los campos más representativos de cada concentración y de cada órgano para tomar las fotografías correspondientes, mismas que se elaboraron en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM.. Estas fotografías sirvieron para apreciar mejor las comparaciones entre la histología normal y la patológica al observar el cambio ocasionado por efecto de los detergentes.

### 3.0 RESULTADOS

#### 3.1 *Bioensayos de toxicidad*

En el diagrama de flujo 1 se muestra el procedimiento seguido para la realización de las pruebas de toxicidad que incluyen una primera etapa de bioensayos y una segunda de histología con cortes histológicos normales y afectados.

Algunos datos merísticos de los peces sometidos a bioensayos de toxicidad se muestran en la Tabla VI, con el propósito de señalar cuales fueron sus características particulares y de mostrar que éstos se encontraron dentro del tamaño y condiciones adecuadas para ser usados experimentalmente.

Los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos determinados durante la realización de los bioensayos con detergentes



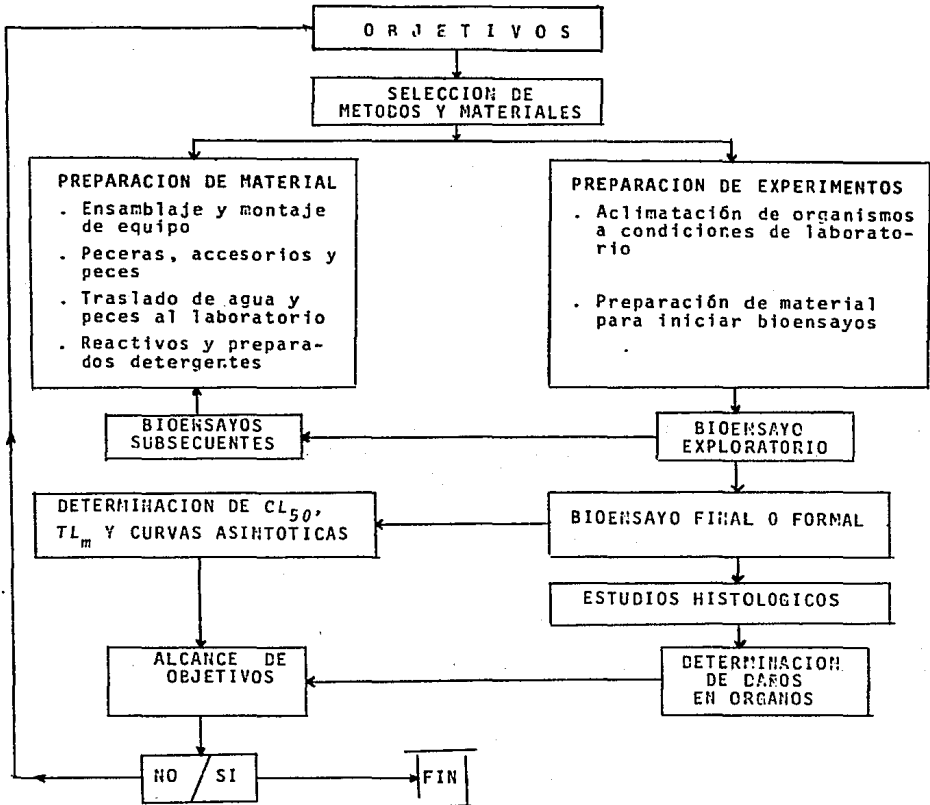


DIAGRAMA DE FLUJO 1

formulados e ingredientes activos, se presentan en la Tabla VII. Los resultados observados muestran que el agua usada en la realización de las pruebas de toxicidad fue la adecuada para la especie seleccionada y que los cambios ocurridos en los parámetros fisicoquímicos fueron debidos a la presencia de los detergentes.

El registro de los peces sobrevivientes en los bioensayos exploratorios usando detergentes formulados comerciales se muestra en la Tabla VIII, con el fin de determinar las concentraciones a las cuales se llevaron a cabo los bioensayos finales. En la gráfica 1 se observan las  $CL_{50}$  preliminares obtenidas a partir de los bioensayos exploratorios.

Las concentraciones usadas en la determinación de las  $CL_{50}$ , así como el registro de peces sobrevivientes con los detergentes formulados  $ABLS_F$ ,  $DBS_F$  y  $MIXTO_F$  en los diferentes tiempos de exposición, se observan en las Tablas IX, X, y XI respectivamente. Las  $CL_{50}$  encontradas, con intervalos de confianza al 95%, se muestran en las gráficas 2, 3 y 4.

Las  $CL_{50}$  encontradas de los 3 detergentes formulados comerciales usados en los diferentes tiempos de exposición, se resumen en la Tabla XII, en la cual se observa que el  $ABLS_F$  fue el detergente formulado más tóxico por presentar una concentración letal media (96 hr) de 3 y casi 5 veces menor que el  $DBS_F$  y

MIXTO<sub>F</sub> respectivamente; esta toxicidad del ABL<sub>S</sub><sub>F</sub> ya se había hecho evidente desde los bioensayos exploratorios.

La gráfica 5 presenta las curvas de toxicidad de cada uno de los detergentes formulados en donde se observa claramente la mayor toxicidad del ABL<sub>S</sub><sub>F</sub>, siguiendo en orden decreciente el DBS<sub>F</sub> y el MIXTO<sub>F</sub>.

Con el propósito de observar la toxicidad entre los ingredientes activos (ABLS, DBS y MIXTO) y de comparar la toxicidad de éstos con los detergentes formulados, se realizó un bioensayo final para determinar el  $LT_m$  de los ingredientes activos cuyo registro de mortalidad se muestra en la Tabla XIII.

Los valores de  $LT_m$  de los ingredientes DBS y MIXTO no se pudieron determinar durante las 96 hr. debido a que no se presentó una mortalidad igual o mayor al 50%, sin embargo se obtuvo un valor de 60% para el ABL<sub>S</sub>, lo que demuestra que éste es el ingrediente activo más tóxico de los tres. Gráfica 6.

La comparación formal de detergentes formulados contra ingredientes activos se analizará posteriormente en la discusión de resultados.

El registro del porcentaje de peces afectados durante los bioensayos finales con detergentes formulados e ingredientes acti

vos, utilizando las concentraciones más bajas empleadas en los bioensayos formales con detergentes formulados, se indica en la TABLA XIV.

Se consideró como pez afectado a todo aquél que presentara cualquier cambio, modificación o alteración en su conducta normal. Estas alteraciones de conducta se muestran en la Tabla XV que señala la sintomatología manifestada por la exposición de las carpas a los detergentes formulados e ingredientes activos.

Los síntomas que se presentaron durante todo el experimento fueron el boqueo continuo y movimientos constantes del opérculo, siendo más acentuados en las primeras 4 hr. de exposición.

La presencia de mucus de la epidermis y branquias se manifestó únicamente durante las 2 primeras horas de exposición, especialmente en el ABL5 y ABL5<sub>F</sub>.

La pérdida del equilibrio se observó como promedio después de las 4 hr de exposición.

Algunos peces se mantuvieron estáticos en la superficie y fondo de la pecera antes y a partir de las 24 hr de exposición respectivamente.

Como síntoma de una muerte próxima, algunos peces presentaron movimientos bruscos y acelerados en posición vertical.

Se consideró la muerte del pez en el momento en el que cesó el movimiento opercular.

Finalmente, la categorización tóxica de los diferentes detergentes e ingredientes activos usados, en función de las  $Cl_{50}$  y del  $LT_m$  encontrados a 96 horas, se muestra en la Tabla XVI.

TABLA VI. DATOS MERISTICOS DE LOS PECES\* SOMETIDOS A BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

PARAMETRO	Promedio $\bar{x}$	Desviación Estándar ST $\sigma$
Peso (gr)	3.25	1.02
Longitud Patrón (cm)	4.58	0.58
Longitud Total (cm)	5.78	0.70

\* Población total = 350 individuos.

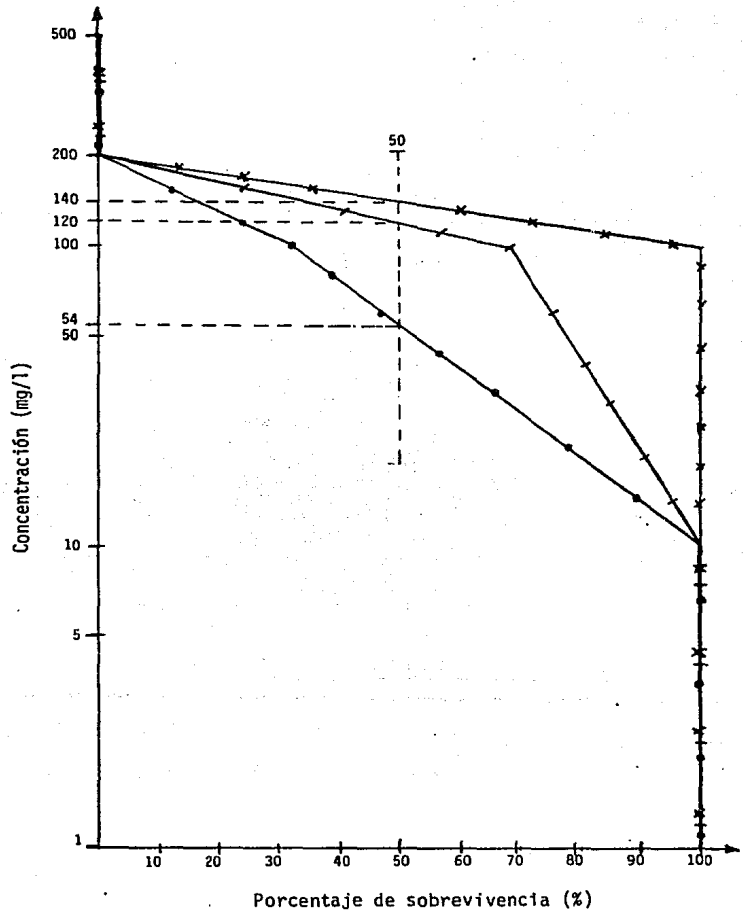
TABLA VII. PROMEDIO DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DEL AGUA USADA PARA LOS BIOENSAYOS FINALES DE TOXICIDAD DE LOS DETERGENTES FORMULADOS COMERCIALES Y SUS INGREDIENTES ACTIVOS EN *Cyprinus carpio*.

Detergente \ Parámetro	pH		Temperatura (°C)	Dureza ppm CaCO <sub>3</sub>		Salinidad ppm
	X	SDT		X	SDT	
ABLS <sub>F</sub> *	8.46	0.18	20 ± 2	76.44	1.97	780
ABLS*	8.55	8.02	20 ± 2	187.50	57.28	620
DBS <sub>F</sub>	7.58	2.43	20 ± 2	72.21	8.77	800
DBS*	8.44	0.04	20 ± 2	125.00	0	620
MIXTO <sub>F</sub>	8.51	0.24	20 ± 2	68.92	2.32	800
MIXTO*	8.39	0.06	20 ± 2	156.20	54.13	640
Testigo	8.15	0.15	20 ± 2	69.35	7.07	670

\* Ingrediente activo

TABLA VIII. REGISTRO DE SOBREVIVENCIA EN LOS BIOENSAYOS EXPLORATORIOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL<sub>50</sub>) DE LOS DETERGENTES FORMULADOS, EN *Cyprinus carpio*

Concentración Detergente mg/l	% DE SOBREVIVENCIA		
	ABLS <sub>F</sub>	DBS <sub>F</sub>	MIXTO <sub>F</sub>
1	100	100	100
5	100	100	100
10	100	100	100
100	33	67	100
200	0	0	0
500	0	0	0



Gráfica No. 1. Concentraciones Letales Medias ( $CL_{50}$ ) para *Cyprinus carpio* obtenidas en el bioensayo exploratorio para los detergentes comerciales

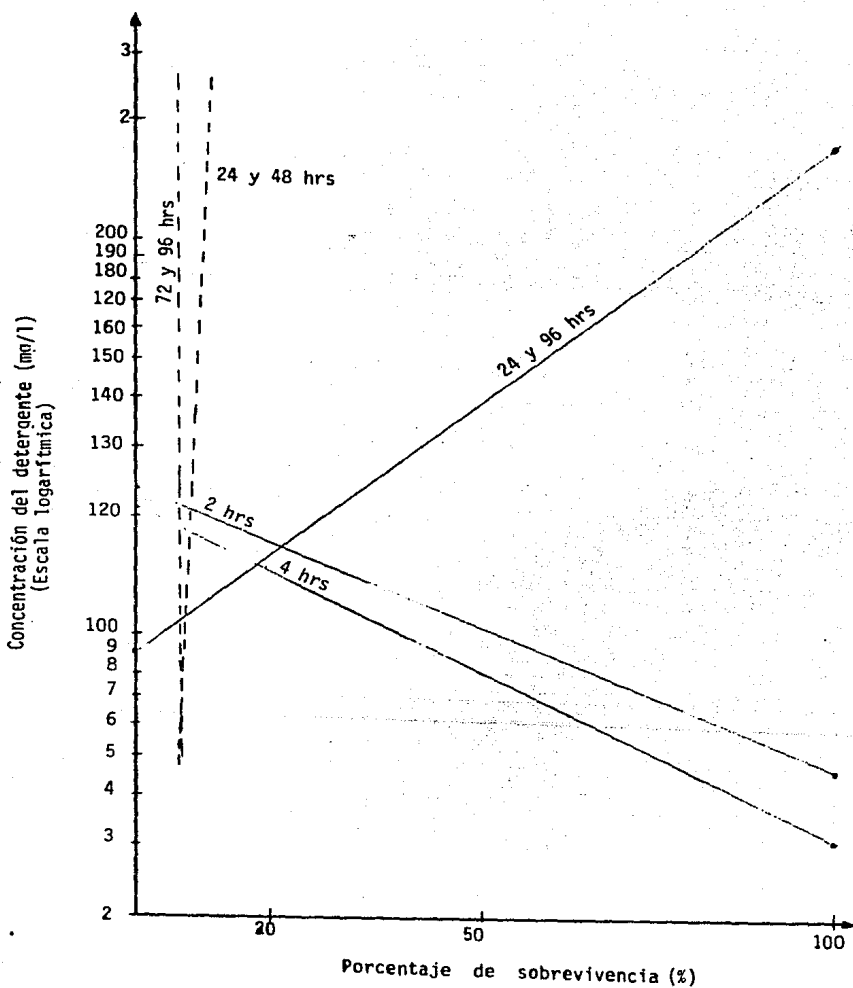
- ABLS<sub>F</sub> ●—●
- DBS<sub>F</sub> +—+
- MIXTO<sub>F</sub> ×—×



TABLA IX. REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DE LOS BIENSAYOS FINALES PARA DETERMINAR LA  $CL_{50}$  DEL DETERGENTE FORMULADO COMERCIAL FABRICADO CON LA BASE ACTIVA ABL5 EN *Cyprinus carpio*.

Concentraciones (mg/l)	Experimento	No. de peces sometidos a prueba	% DE SOBREVIVIENTES EN HORAS											
			2	X	4	$\bar{X}$	24	X	48	X	72	X	96	X
50	original	5	100		80		70	20	10	20	10	20	10	20
	réplica	5	60	80	60		0	0	0	0	0	0	0	0
75	original	5	80		40		40	0	0	0	0	0	0	0
	réplica	5	40	60	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
125	original	5	80		40		40	20	10	20	10	20	10	20
	réplica	5	40	60	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
150	original	5	20		20		10	0	0	0	0	0	0	0
	réplica	5	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
175	original	5	60		40		20	40	20	40	20	20	20	10
	réplica	5	0	30	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
$CL_{50}$	original		131.11		92.95		82	<50	46*	<50	46*	<50	31*	<50
	réplica		71.36	101	71.16		<50		<50		<50		<50	31*
Intervalos del límite de confianza al 95%			114.24		85.97									
			88.24		78.2									

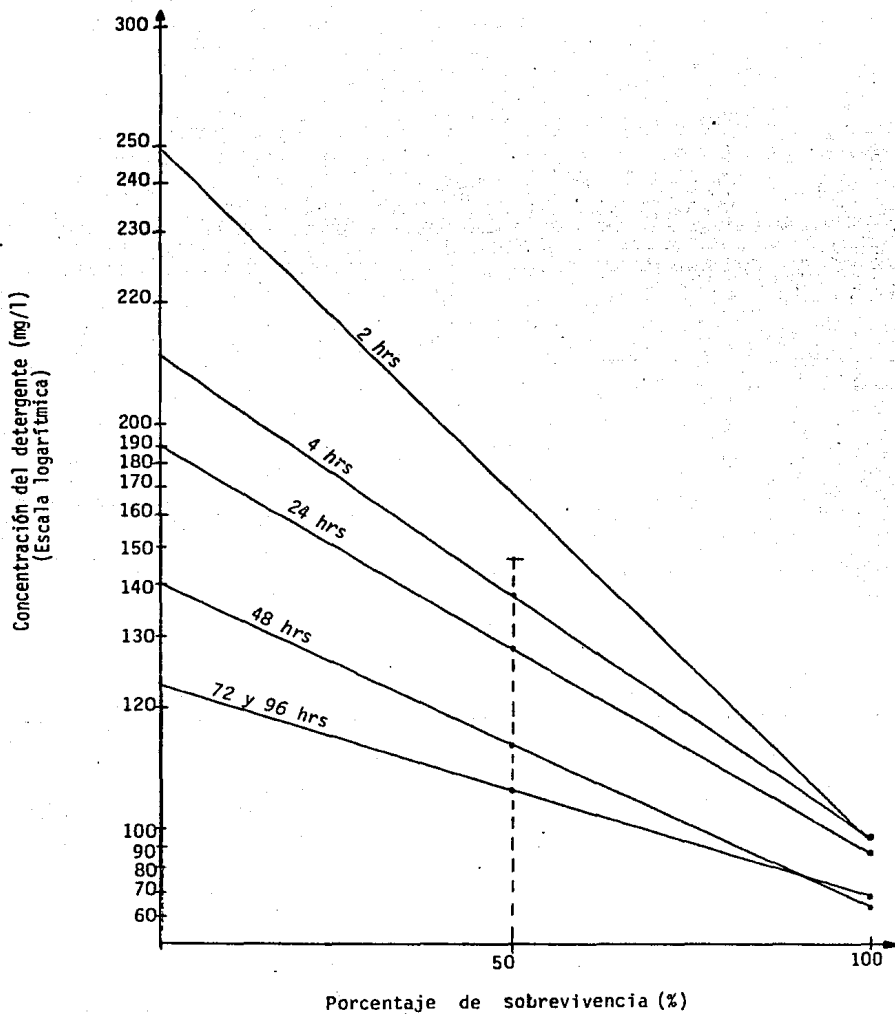
\* Valores obtenidos por método gráfico en papel logarítmico



Gráfica No. 2. Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) para *Cyprinus carpio* en diferentes tiempos de exposición en el detergente formulado comercial ABL<sub>5F</sub>.

TABLA X. REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DE LOS BIOENSAYOS FINALES PARA DETERMINAR LA  $CL_{50}$  DEL DETERGENTE FORMULADO COMERCIAL FABRICADO CON LA BASE ACTIVA DBS, EN *Cyprinus carpio*.

Concentraciones (mg/l)	Experimento	No. de peces sometidos a prueba	% DE SOBREVIVIENTES EN HORAS														
			2	X	4	X	24	X	48	X	72	X	96	X			
75	original	5	100		100		100	100	80	90	80	70	80	80	70	80	70
	réplica	5	100	100	100	100	100	80			60		60		60		60
95	original	5	100		100		80	100	80	70	80	60	80	80	60	80	60
	réplica	5	100	100	60		40				40		40		40		40
115	original	5	80		80		90	80	60	80	60	80	20	50	80	20	50
	réplica	5	100	90	100						40		20		20		20
135	original	5	80		80		90	80	60	70	80	70	80	70	80	60	70
	réplica	5	100	90	40			60			60		60		60		60
155	original	5	60		40		50	40	40	40	20	30	20	20	20	20	20
	réplica	5	40	50	40			40			40		20		20		20
$CL_{50}$	original		190.63		150.93		138	150.97		128	126.07	111	126.07	105	126.02		105
	réplica		144.69	168	105.65			105.65			96.17		83.97		83.96		83.96
Intervalo de confianza al 95%	superior		213.6		163.5			173.6			141.0		147.1		147.1		
	inferior		121.8		113.3			83.3			81.2		62.9		62.9		



Gráfica No. 3. Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) para *Cyprinus carpio* en diferentes tiempos de exposición en el detergente formulado comercial DBS<sub>F</sub>.

TABLA XI. REGISTRO DE SOBREVIVENCIA DE LOS BIOENSAYOS FINALES PARA DETERMINAR LA  $CL_{50}$  DEL DETERGENTE  
 FORMULADO COMERCIAL FABRICADO CON LA BASE ACTIVA MIXTA EN *Cyprinus carpio*.

Concentraciones (mg/l)	Experimento	No. de peces sometidos a prueba	% DE SOBREVIVIENTES EN HORAS														
			2	$\bar{X}$	4	$\bar{X}$	24	$\bar{X}$	48	$\bar{X}$	72	$\bar{X}$	96	$\bar{X}$			
110	original	5	100		80		80		60		60		60		60		70
	réplica	5	80	90	80		80		80	70	80		80	70	80		80
130	original	5	100		60		50		60		60		60		60		60
	réplica	5	80	90	40		50		40	50	40		40	50	40		40
150	original	5	80		80		80		80		80		80		80		80
	réplica	5	80	80	80		80		80	80	80		80	80	80		80
170	original	5	0		0		10		0		0		0		0		0
	réplica	5	20	10	20		10		20	10	20		20	10	20		20
190	original	5	60		0		10		0		0		0		0		0
	réplica	5	20	40	20		10		20	10	20		20	10	20		20
$CL_{50}$	original		157.18		143.45		145		141.19		141.19		141.19		141.19		141.19
	réplica		152.2	154	145.75		145	145.75	143	145.75	143	145.75	143	145.75	143	145.75	143
Intervalos del límite de con- fianza al 95%	superior		159.7		146.9				148		148		148		148		148
	inferior		149.7		148.3				139		139		139		139		139

Gráfica No. 4. Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) para *Cyprinus carpio* en diferentes tiempos de exposición en el detergente formulado comercial MIXTO<sub>F</sub>

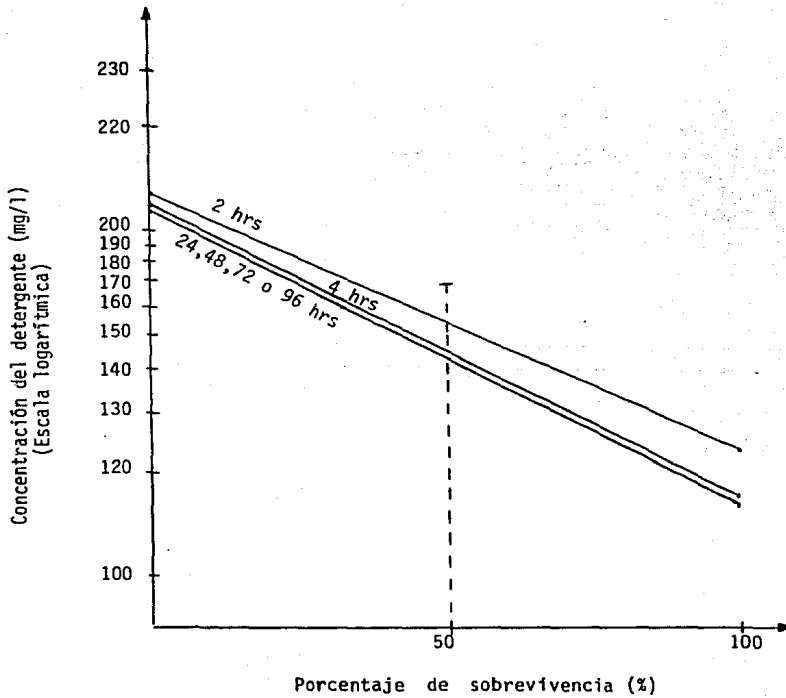
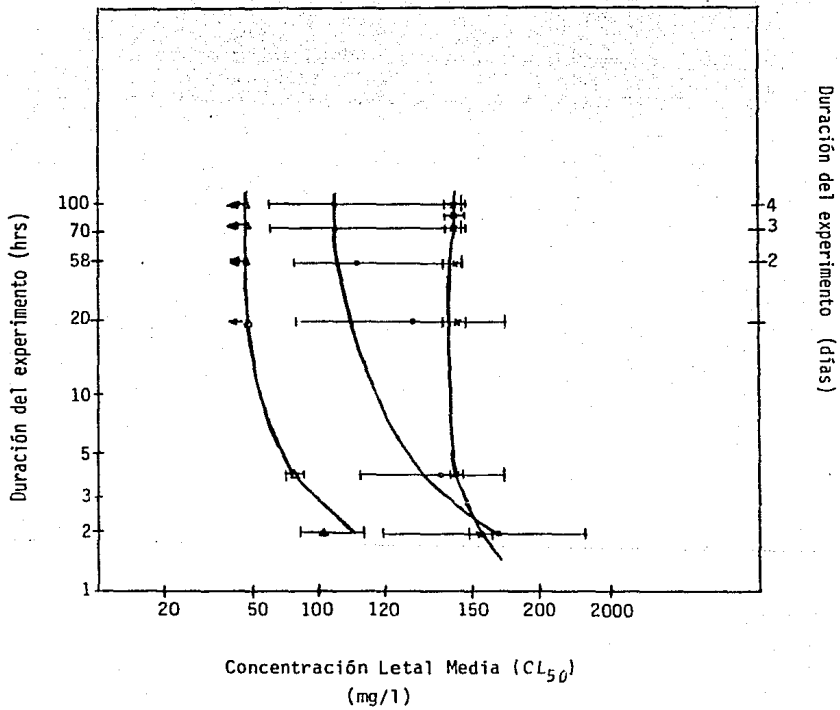


TABLA XII. CONCENTRACIONES LETALES MEDIAS (CL<sub>50</sub>) PARA DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION EN LOS DETERGENTES FORMULADOS COMERCIALES, EN *Cyprinus carpio*

Tiempo de Exposición (horas)	ABLS <sub>F</sub> (mg/l)	DBS <sub>F</sub> (mg/l)	MIXTO <sub>F</sub> (mg/l)
2	101.2	167.7	154.7
4	82.0	138.4	144.6
24	46.0	128.3	143.5
48	46.0	111.1	143.5
72	31.0	105.0	143.5
96	31.0	105.0	143.5

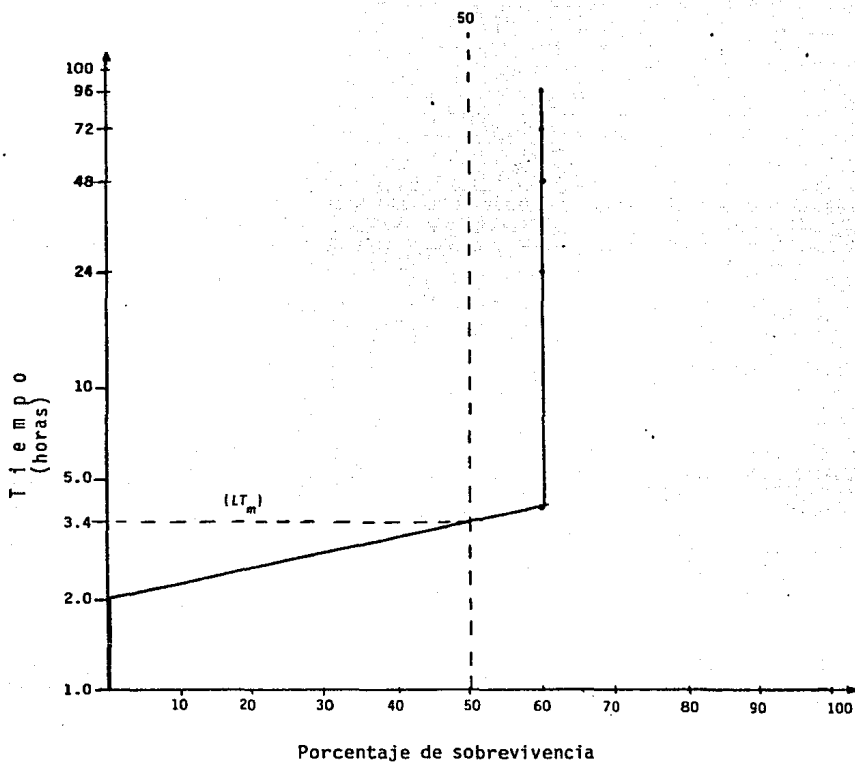


Gráfica No. 5. Curvas de toxicidad de los detergentes formulados comerciales ABL<sub>5F</sub>, DBS<sub>5F</sub> y MIXTO<sub>5F</sub> en *Cyprinus carpio*



TABLA XIII. REGISTRO DE MORTALIDAD, EN LOS BIOENSAYOS PARA DETERMINAR  $LT_m$  DE LOS INGREDIENTES ACTIVOS ABL5, DBS Y MIXTO EN *Cyprinus carpio*.

	Concentración (mg/l)	PORCENTAJE DE MORTALIDAD (hr)						$LT_m$
		2	4	24	48	72	96	
ABL5	16.36	0	60	60	60	60	60	3.4
DBS	22.31	0	20	40	40	40	40	>96
MIXTO	28.19	0	0	20	20	20	20	>96



Gráfica No. 6. Límite de Tolerancia Medio ( $LT_m$ ) para *Cyprinus carpio* con el detergente formulado ABLF

TABLA XIV. REGISTRO DE PECES AFECTADOS DURANTE LOS BIOENSAYOS UTILIZANDO DETERGENTES FORMULADOS E INGREDIENTES ACTIVOS EN *Cyprinus carpio*.

	Concentración (mg/l)	PORCENTAJE DE PECES AFECTADOS (hr)		
		0.5	1.0	96
ABLS <sub>F</sub>	50	100	100	100
DBS <sub>F</sub>	75	100	100	100
MIXTO <sub>F</sub>	110	50	60	100
ABLS	16.86	100	100	100
DBS	22.31	100	100	100
MIXTO	28.19	100	100	100

TABLA XV. SINTOMATOLOGIA DE *Cyprinus carpio* DURANTE LA REALIZACION DE LOS BIOENSAYOS FORMALES DE TOXICIDAD DE INGREDIENTES ACTIVOS Y DETERGENTES

SINTOMAS	Frecuencia del Síntoma en el Detergente Formulador Comercial			Frecuencia del síntoma en el ingrediente activo		
	MIXTO <sub>F</sub>	DBS <sub>F</sub>	ABLS <sub>F</sub>	MIXTO	DBS	ABLS
Boqueo continuo (1)	****	****	****	****	****	****
Presencia de mucus en la epidermis y branquias(2)	**	**	***	*	**	***
Movimientos rápidos y continuos de las aletas pectorales (1)	****	****	****	****	****	****
Desplazamientos lentos (5)	****	****	****	***	**	***
Pérdida del equilibrio (3)	***	***	***	**	**	**
Sin desplazamientos(en el fondo de la pecera) (4)	***	***	***	****	****	****
Sin desplazamientos (en la superficie de la pecera) (6)	***	***	***	***	***	***
Movimientos continuos del opérculo (1)	***	***	***	***	***	***
Movimientos acelerados (bruscos y alocados) (5)	**	**	**	**	**	**
Posición vertical (4)	**	**	**	**	**	**

- 1) Se presentó durante todo el experimento, siendo más acentuado en las primeras 4 hr.
- 2) Se presentó únicamente durante las 2 primeras hr. del experimento
- 3) Se presentaron después de las 4 hr. de exposición
- 4) Se presentó a partir de las 24 hr. de exposición
- 5) Posteriormente ocurrió la muerte
- 6) Se presentó antes de las 24 hr. de exposición

- \*\*\*\* Síntoma presente en el 100% de la población aproximadamente
- \*\*\* Síntoma presente en el 75% de la población aproximadamente
- \*\* Síntoma presente en el 50% de la población aproximadamente
- \* Síntoma presente en el 25% de la población

TABLA XVI. CATEGORIZACION TOXICA PARA LAS 96 HORAS DE LOS DIFERENTES DETERGENTES E INGREDIENTES ACTIVOS USADOS

DETERGENTES E INGREDIENTES ACTIVOS	PARAMETRO DE TOXICIDAD EVALUADO	CATEGORIA DE TOXICIDAD
ABLS <sub>F</sub>	CL <sub>50</sub>	Tóxico
DBS <sub>F</sub>	CL <sub>50</sub>	Moderadamente tóxico
MIXTO <sub>F</sub>	CL <sub>50</sub>	Moderadamente tóxico
ABLS	LT <sub>m</sub>	Tóxico
DBS	LT <sub>m</sub>	--
MIXTO	LT <sub>m</sub>	--

-- No se pudo determinar

### 3.2 Estudios histológicos

A continuación se presenta una breve descripción de los órganos usados en los bioensayos de toxicidad, con el objeto de facilitar la observación e identificación de los daños causados por efecto de los detergentes, ya que no es propósito de este trabajo el mostrar un estudio detallado de la histología de los órganos empleados.

#### Branquias

La carpa, como teleosteo que es, tiene 5 pares de arcos branquiales, cada arco está formado por delgadas láminas branquiales que se dividen a su vez en laminillas. La superficie de éstas está cubierta por una doble capa de células epiteliales, por una gran cantidad de capilares y por células pilares. El lumen de los capilares se encuentra ocasionalmente ocupado por eritrocitos, las células pilares delimitan o rodean a los capilares.

Entre las láminas branquiales se encuentran células interlamelares y en los espacios de éstas se hallan las glándulas mucosas que aunque no se presentan constantemente en todos los espacios, sí tienen un arreglo ordenado.

En cortes longitudinales, se observan filas de cartilago hialino

no corriendo, a lo largo y al centro de cada lámina branquial; perpendicularmente a ellas y superior al inicio del arco branquial se encuentra tejido conjuntivo laxo. Ver láminas 2 y 3.

Los daños histológicos observados en este órgano por efecto de los detergentes formulados se muestran en la Tabla XVII.

Los disturbios más evidentes ocasionados por los tres detergentes son la invasión de eritrocitos tanto en láminas branquiales como en tejido conjuntivo (láminas 4, 5 y 6), exfoliación de las células epiteliales y pilares, así como la desintegración de éstas y de las glándulas mucosas (láminas 4 y 8) además de la expansión del lumen capilar (láminas 7 y 8).

De los tres detergentes probados, el más tóxico fue el ABL<sub>S</sub><sub>F</sub>, nótese en las láminas 9 y 10 como la branquia pierde toda organización, desintegrándose prácticamente todos sus componentes celulares, especialmente en la concentración más elevada.

Otro daño que llama particularmente la atención, es la proliferación de condrocitos (lámina 11) que se presenta únicamente con el detergente biodegradable y que no ha sido reportado por otros autores. Lo mismo sucede con la desintegración del tejido conjuntivo. (Lámina 5).



Lâmina 2. Corte longitudinal de branquia normal de *C. carpio*.  
H.E.200X



Lâmina 3. Corte longitudinal de branquia normal de *C. carpio*.  
H.E., 240X

cp - célula pilar	gl - glândula mucosa
ce - célula epitelial	cr - cartilago
c - capilar	e - eritrocito



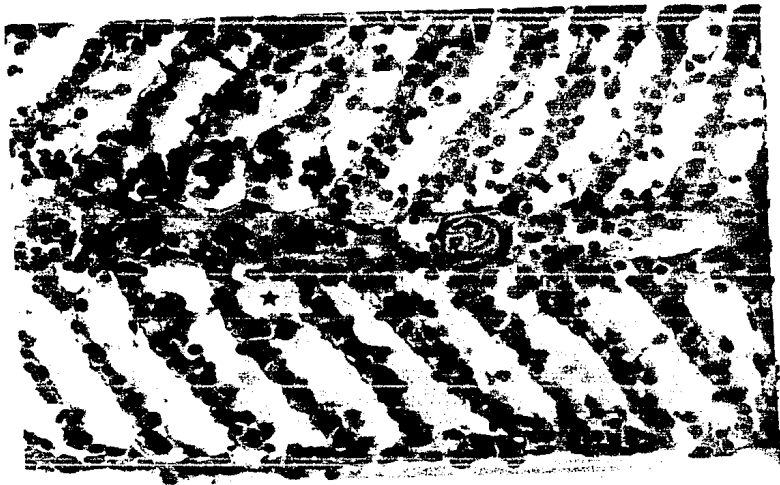


Lámina 4. Corte longitudinal de branquia de *C. carpio* tratada con  $DBSF - 15 \text{ mg/l}$ . H.E., 290 X.  
 (★) eritrocito; (★) ausencia de glándulas mucosas.



Lámina 5. Invasión de enterocitos en tejido conjuntivo y en láminas branquiales en branquia de *C. carpio* tratada con  $ABLSF - 175 \text{ mg/l}$ . H.E., 200X.



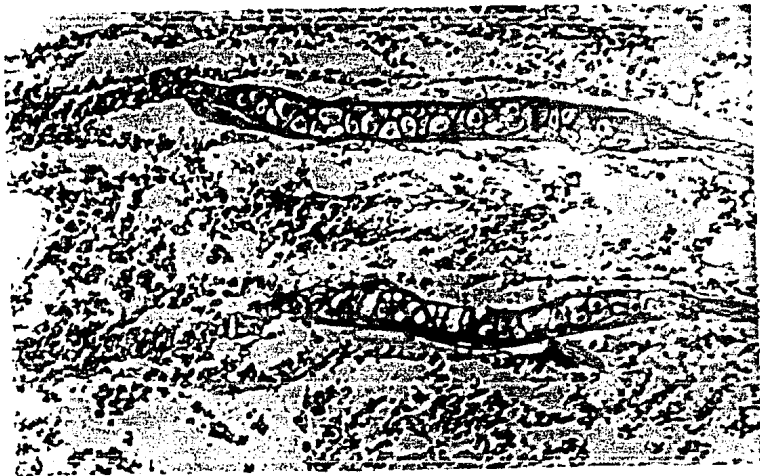
Lámina 6. Eritrocitos en tejido conjuntivo de branquia de *C. carpio* tratada con ABL5<sub>F</sub> - 50 mg/l, H.E., 1500X.



Lámina 7. Dilatación del lumen capilar (★) en laminilla branquial de *C. carpio* tratada con D8S<sub>F</sub> - 155 mg/l. H.E. Contraste de fases, 700X.



Lámina 8. Exfoliación de células pilares y epiteliales (↑) y dilatación del lumen capilar (★) en laminillas branquiales de *C. carpio* tratadas con MIXTO<sub>F</sub> - 190 mg/l. H.E., 1000 X.



Láminas 9 y 10. Cortes longitudinales de branquias de *C. ca*  
 pio tratadas con ABL5 - 175 y 50 mg/l res-  
 pectivamente. H.E. Contraste de fases 290X,  
 120X. Nótese la casi total destrucción de  
 la lámina branquial.

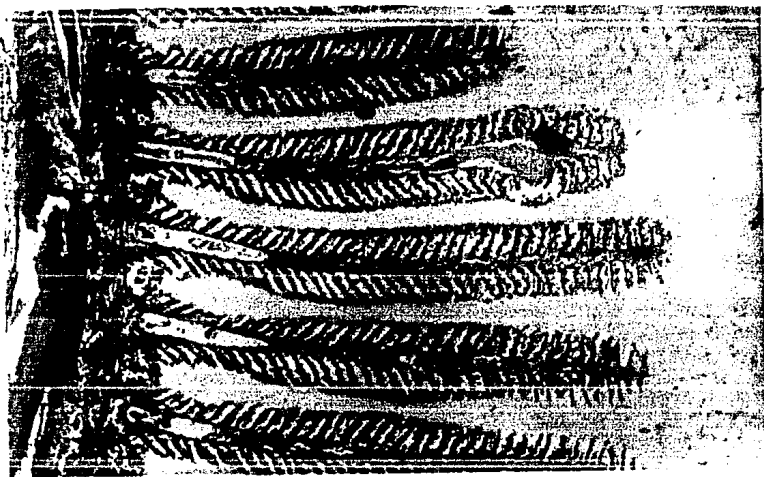
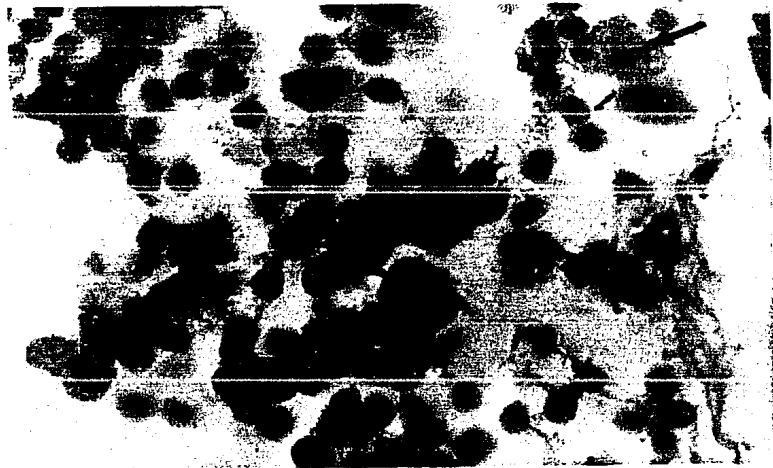


Lámina 11. Proliferación de condrocitos (↑) en branquias de *C. carpio* tratada con ABLS<sub>F</sub> - 50 mg/l. H.E., 100X.



Lámina 12. Proliferación de células interlamelares en lámina branquial de *C. carpio* tratada con MIXTO<sub>F</sub> - 190 mg/l. H.E., 200X.



Lamina 13. Secreciones de glándulas mucosas (↑) de branquia de *C. carpio* tratada con MIXTO<sub>F</sub> - 190 mg/l, H.E., 1000X.

La proliferación de células interlamelares es un daño presente solamente para el detergente MIXTO<sub>F</sub>. Ver lámina 11.

En la lámina 13 se observan secreciones producidas por las glándulas mucosas, mismas que fueron evidentes sólo para el DBS<sub>F</sub> y MIXTO.

La presencia de linfocitos y de células plasmáticas se consideró como una respuesta moderada a la acción de los detergentes, ver lámina 7.

#### Riñón

En el corte transversal de la lámina 14 se observa que el riñón está formado por corpúsculos y túbulos renales y por tejido conjuntivo.

El corpúsculo renal está formado a su vez por el glomérulo renal y la cápsula de Bowman, esta cápsula tiene una pared interna y otra externa de células epiteliales aplanadas y alargadas.

Los túbulos están formados por células epiteliales cúbicas con núcleo basal, cilios o microvellocidades (dependiendo del tipo de túbulo: distal o proximal) en el lumen tubular.

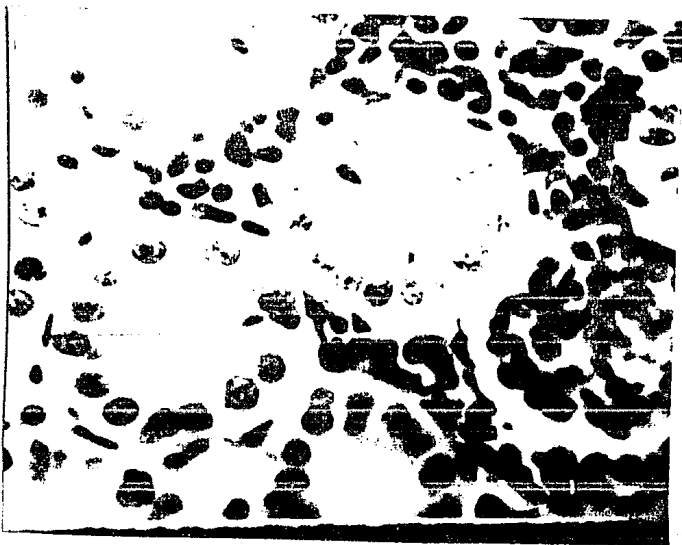


Lámina 14. Corte transversal de riñón de *C. carpio* tomada de: Hibiya, 1982.

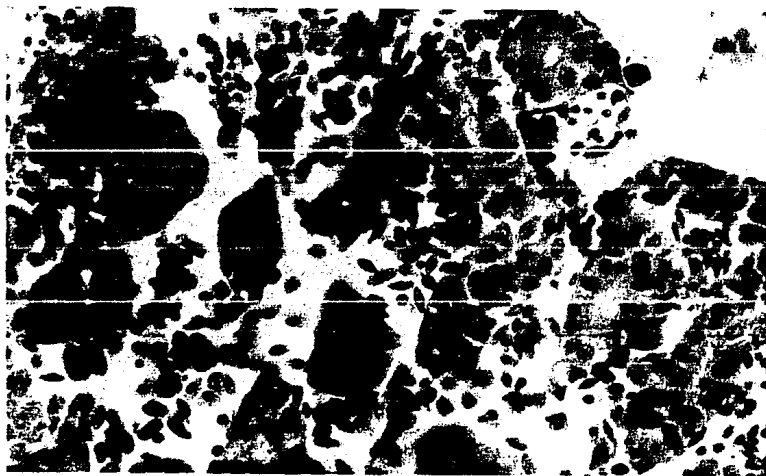


Lámina 15. Invasión de eritrocitos, linfocitos y células plasmáticas en riñón de *C. carpio*, tratado con ABL5 F-175 mg/l. H.E., 200X.



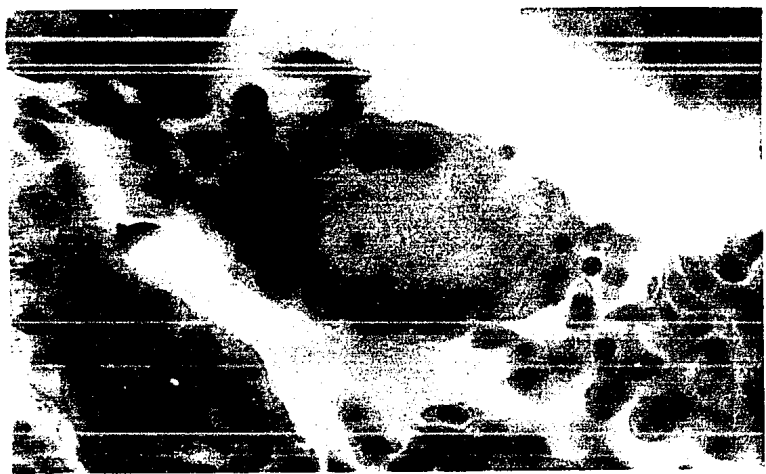


Lámina 16. Oclusión del lumen tubular en riñón de *C. carpio* tratado con DBS<sub>F</sub> - 155 mg/l. H.E., 1500X.



Lámina 17. Oclusión del lumen tubular, condensación de cromatina, pérdida de definición tubular y de límites celulares en riñón de *C. carpio* tratado con ABLS<sub>F</sub> 175 mg/l. H.E., 1500X.



Lámina 18. Rompimiento de cápsula de Bowman (↑) por efecto del detergente DBS - 155 mg/l en riñón de *C. carpio*. Glomérulo renal (★). H.E., 1500X.

El tejido conjuntivo está formado por células reticulares, gran cantidad de capilares y células sanguíneas.

En la Tabla XVIII se mencionan los daños histológicos observados como respuesta al uso de detergentes.

La oclusión del tubo renal, la invasión de eritrocitos, linfocitos y células plasmáticas fueron los daños que se presentaron, en mayor o menor medida, para los tres detergentes (Láminas 15 y 16). Hubo algunos que se presentaron de manera frecuente, especialmente para el ABLST<sub>F</sub>, como lo fué la cromatina condensada de los núcleos de las células tubulares, la pérdida de los límites celulares y de definición tubular. (Lámina 17).

Desgraciadamente no se observó en todas las laminillas histológicas realizadas la presencia de cápsula de Bowman, por lo que en algunos casos no fue evidente su destrucción (lámina 18), sin que signifique que el daño no estuvo presente.

#### Hígado

La superficie del hígado está cubierta por una membrana serosa y por tejido conjuntivo, parte de él se extiende al parénquima hepático, formado por las células hepáticas o hepatocitos.

La arteria hepática y la vena porta se introducen al parénquima, esta última se ramifica y en ocasiones se divide en gran cantidad de capilares sanguíneos llamados sinusoides. Las células hepáticas se encuentran entre los capilares en forma de trabéculas o cordones celulares con ramificaciones múltiples, conocidos como cordones hepáticos. Cinco o seis hepatocitos (Welsch y Storch, 1976) rodean a los canalículos biliares que se hallan en el centro de cada cordón. (Ver lámina 19).

La pérdida de cordones hepáticos y del límite celular así como la infiltración de eritrocitos y linfocitos fueron los daños causados por la acción de los detergentes probados, se muestran en la Tabla XIX y en las láminas 20 y 21.

Los daños más severos se observaron con el  $ABLS_F$  disminuyendo para el  $DBS_F$  y  $MIXTO_F$ .

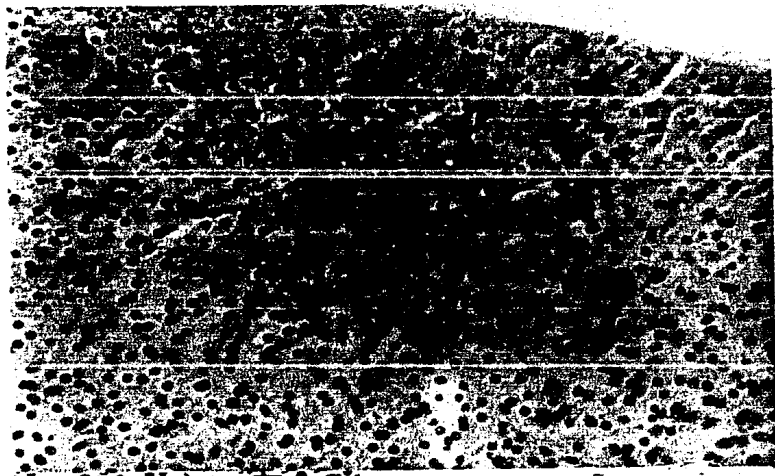
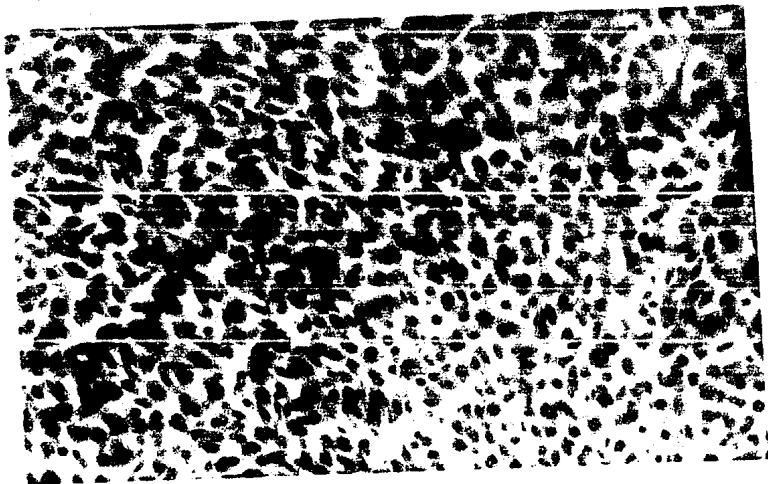
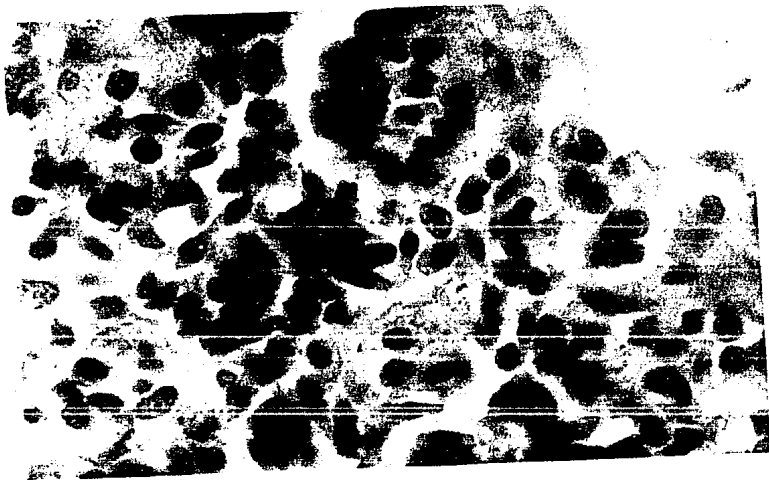


Lámina 19. Corte transversal de hígado normal de *C. carpio*.  
H.E., 100X.



Láminas 20 y 21. Infiltración de eritrocitos, linfocitos y células plasmáticas. Pérdida de cordones hepáticos y del límite de hepatocitos (abajo). H.E. 1500X y 250X.

TABLA XVII. DAÑOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN BRANQUIAS DE *C. carpio* POR EFECTO DE LOS DETERGENTES FORMULADOS ABL<sub>F</sub>, DBS<sub>F</sub> Y MIXT<sub>F</sub>.

Daños Causados	Concentraciones (mg/l)	ABL <sub>F</sub>		DBS <sub>F</sub>		MIXT <sub>F</sub>	
		50	175	75	155	110	190
Invasión de eritrocitos en lámina branquial		***	***	***	***	*	**
Invasión de eritrocitos en tejido conjuntivo		**	***	-	-	-	-
Desintegración de glándulas mucosas		***	***	**	**	*	**
Secreciones de las glándulas mucosas		-	-	*	*	***	***
Exfoliación de células pilares y epiteliales		***	***	***	***	*	**
Expansión del lumen capilar		***	***	**	**	**	***
Proliferación de condrocitos		***	***	-	-	-	-
Presencia de linfocitos y células plasmáticas		**	**	**	**	*	*
Desintegración del tejido conjuntivo laxo		***	***	-	-	-	-
Proliferación de células interlamelares		-	-	-	-	**	***

- No se presentó  
 \* Incipiente  
 \*\* Moderado  
 \*\*\* Severo

TABLA XVIII. DAÑOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN CORTES DE RIÑON DE *C. carpio* POR EFECTO DE LOS DETERGENTES ABL<sub>S</sub>F, DBS<sub>F</sub> Y MIXT<sub>O</sub>F.

DAÑOS CAUSADOS	CONCENTRACIONES (mg/l)		ABLS <sub>F</sub>		DBS <sub>F</sub>		MIXT <sub>O</sub> F	
	50	175	15	155	110	190		
Oclusión del lumen del túbulo renal	***	***	**	***	*	*		
Destrucción de la cápsula de Bowman	Δ	Δ	Δ	**	Δ	Δ		
Pérdida de los límites celulares en túbulos renales	**	***	-	*	-	-		
Invasión de eritrocitos	***	***	**	**	**	**		
Invasión de linfocitos y células plasmáticas	**	***	**	**	**	**		
Cromatina condensada	**	***	-	**	-	-		
Pérdida de tejido conjuntivo								**
Pérdida de definición tubular	**	**	-	-	-	-		

Δ no se observó  
 - no se presentó  
 \* incipiente  
 \*\* moderado  
 \*\*\*severo



TABLA XIX. DAÑOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN CORTES DE HIGADO DE *C. carpio* POR EFECTO DE LOS DETERGENTES ABL<sub>F</sub>, DBS<sub>F</sub> Y MIXT<sub>F</sub>.

Daños Causados	Concentraciones (mg/l)	ABL <sub>F</sub>		DBS <sub>F</sub>		MIXT <sub>F</sub>	
		50	115	75	155	110	190
Pérdida del límite celular		***	***	*	**	*	*
Pérdida de cordones hepáticos		***	***	*	*	*	*
Infiltración de eritrocitos y linfocitos		***	***	**	**	*	*

\* Incipiente  
 \*\* Moderado  
 \*\*\* Severo

#### 4.0 DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio están sujetos a las características particulares de los productos sometidos a prueba, al método usado, tipo de experimento (bioensayo estático a corto plazo), condición específica de los organismos probados y tipo y características del agua usada. De esta manera, los resultados obtenidos quedan como una medida de toxicidad aguda de los ingredientes activos y de sus detergentes formulados para 96 hr. en *C. carpio*, más no como un índice de sobrevivencia en peces por tiempos indefinidos. Esta toxicidad indica el potencial nocivo de los productos evaluados, bajo condiciones de laboratorio.

Las oscilaciones observadas en los parámetros fisicoquímicos, son ocasionadas por la presencia de los detergentes formulados

e ingredientes activos, principalmente por el aumento de la dureza y salinidad. Algunos autores mencionan que ciertas variaciones en los parámetros fisicoquímicos influyen directamente en la toxicidad del producto, que, al interactuar con otras propiedades particulares de los detergentes ocasionan la muerte de los peces. (Abel, op. cit.; Henderson et al, 1959; Hokanson et al, op cit.).

Los bioensayos exploratorios mostraron las concentraciones requeridas para realizar los bioensayos finales, indicando superficialmente la toxicidad de los diferentes productos estudiados, siendo la más evidente la del detergente ABL<sub>S<sub>F</sub></sub>.

Las  $CL_{50}$  encontradas para el ABL<sub>S<sub>F</sub></sub> (Tabla IX) muestran que la toxicidad de este producto se hace evidente desde el inicio del experimento, aumentando la nocividad conforme transcurre su desarrollo. Es importante hacer notar que la toxicidad del producto aumenta un cincuenta y cinco por ciento (101.2 a 46.0 mg/l) durante los tiempos iniciales de exposición (2 a 24 hrs) tendiendo a estabilizarse el efecto nocivo durante el resto del experimento.

El comportamiento descrito anteriormente hace suponer que durante las primeras 24 horas el detergente no ha empezado a biodegradarse o bien que esta degradación sea tan incipiente que no se ha hecho evidente en ese período, debido a esto en las

primeras horas la toxicidad del producto aumenta notoriamente. Se conocen 2 tipos de biodegradación: primaria y terminal. En la primera los microorganismos atacan solo una parte de la molécula y la segunda ocurre cuando la molécula del tensoactivo es degradada hasta  $CO_2$  y agua; por lo que, no debe excluirse la posibilidad de que la degradación ocurra desde un principio y que los causantes de la marcada toxicidad sean precisamente los compuestos originados por la degradación primaria, pues como la menciona Montes de Oca (1986) estos compuestos pueden ser más nocivos que el compuesto original.

Lamentablemente, es difícil saber en este tipo de estudio cual de las dos posibilidades es la causante del notable incremento de toxicidad durante las primeras horas de exposición, por lo que se sugieren estudios de biodegradación usando el mismo tipo de agua utilizada en esta experimentación, recordando que la biodegradación va a depender de la eficiencia y diversidad de los microorganismos presentes en el agua.

La estabilización en la toxicidad que ocurre de las 24 a las 96 hr puede ser debida a que el detergente ha empezado a biodegradarse o a que se ha hecho evidente o bien a que los productos originados de la degradación primaria han sido degradados, por lo que la toxicidad no aumenta tan acentuadamente aunque sigue incrementándose debido a un posible efecto acumulativo o

que la molécula de detergente no se ha degradado totalmente, de esta manera la intensidad se atenúa, pero no la toxicidad.

Los valores de  $CL_{50}$  para el detergente  $DBS_F$  (Tabla X) muestran también que la toxicidad del producto se incrementa conforme aumenta el tiempo de exposición, sin embargo, este detergente tiene un comportamiento diferente al  $ABLS_F$ , pues mientras este último presenta aumentos notables de toxicidad en un corto período de tiempo, el  $DBS_F$  la incrementa paulatinamente hasta hacerse constante para las 72 y 96 hr. Este hecho probablemente se deba a que el  $DBS$  al ser un detergente duro o de baja biodegradabilidad su comportamiento es más estable que el  $ABLS_F$  como se observa en los resultados, siendo también acumulativa su toxicidad, de tal manera que la  $CL_{50}$  a las 96 hr es más pequeña que a las 2 hr de exposición.

La  $CL_{50}$  para el detergente  $MIXTO_F$  (Tabla XI) fue acentuada a las primeras 2 hr en comparación con las siguientes 4 a 96 hr en donde la  $CL_{50}$  permanece casi constante. En este comportamiento se observa un desarrollo similar al del  $ABLS_F$ ; esto era de esperarse debido a que el detergente en cuestión es una mezcla de sus respectivos ingredientes activos. Es probable que el efecto tóxico de las 2 primeras horas sea debido principalmente a la acción del  $ABLS_F$  pues la  $CL_{50}$  a las 2 hr es mayor para el  $MIXTO_F$  que para el  $DBS_F$  y conforme transcurre el

experimento, el comportamiento se asemeja al del  $DBS_F$  por ser éste no biodegradable y el que se encuentra en mayor proporción, sin olvidar el efecto aditivo del  $ABLS_F$  aunque no tan acentuado por no estar en gran cantidad y por la degradación a la que ha estado sujeto. Se aprecia que a las 96 hr el efecto tóxico letal es menor para el  $MIXTO_F$  que para el  $DBS_F$ , contrariamente con lo observado al principio del experimento lo que viene a apoyar la hipótesis de que durante las primeras horas de exposición es el detergente biodegradable el que ejerce principalmente el efecto tóxico.

De lo anterior se concluye que en orden decreciente la toxicidad se presenta de este modo:  $ABLS_F$ ,  $DBS_F$ ,  $MIXTO_F$  para 96 hr de exposición.

La determinación de toxicidad de los ingredientes activos se realizó con el propósito de observar el efecto de los agentes aditivos de los detergentes formulados, con respecto a la toxicidad de ambos productos, es decir, la diferencia en toxicidad entre ingredientes activos y detergentes formulados está dada por la presencia de los compuestos aditivos en los detergentes. Lo anterior se obtuvo mediante el límite de tolerancia medio, se partió del hecho de que ya se conocían las  $CL_{50}$  de los detergentes formulados por lo que se calculó y se sometió a prueba una concentración única para cada ingrediente ac-

tivo, equivalente a la contenida en las  $CL_{50}$  - 96 hr de cada detergente (ver métodos).

De los resultados obtenidos (Tabla XIII) se observa que, en general, los ingredientes activos son menos tóxicos que los detergentes formulados, contrariamente a lo reportado por Henderson et al, 1959 en *Pimephales promelas* y Cairns et al, 1962 quienes mencionan que los ingredientes activos pueden ejercer un ligero efecto antagónico con los aditivos provocando una disminución de la toxicidad; sin embargo, Abel, 1974 refiere en un artículo que los aditivos comunes de los detergentes contribuyen en su toxicidad; además, no debe excluirse que los detergentes formulados tienen una gran cantidad de compuestos aditivos que de acuerdo con la marca usada, varían en porcentaje y en composición.

Henderson et al, comentan que el ingrediente activo usado pudo no haber sido exactamente el mismo que el que contenían los detergentes sintéticos probados, pues como se mencionará más adelante, son muchas las variables que existen en la identificación de surfactantes y detergentes formulados; este no fue el caso del presente estudio debido a que se usaron detergentes de una sola marca comercial (Fab Limón) facilitándose y asegurándose así, la obtención de los respectivos ingredientes activos para cada detergente.

La disparidad de resultados no es poco común en trabajos de toxicidad con detergentes e ingredientes activos, por lo que se sugiere que para propósitos de investigación se usen bases activas (Abel, op. cit.) o bien que se especifiquen el contenido y cantidades de los aditivos en los detergentes formulados usados, como se hace en este estudio, para facilitar la comparación o bien para hacerla más certera.

Por lo que concierne a la toxicidad de los ingredientes activos en particular, se observó que el ABL5 fue el más tóxico de los tres, coincidiendo con los resultados anteriores, siguiendo en orden el DBS y MIXTO. El ABL5 fue al único que pudo determinársele  $LT_m$  a las 96 hr, pues en los otros dos surfactantes no se observó el 50% de mortalidad durante las 96 hr de exposición, lo que hace suponer que el  $LT_m$  es mayor de las 96 hr o bien la concentración a la que se sometió a prueba es menor de 22.3 y 28.2, para DBS y MIXTO respectivamente.

Por otro lado, diferentes autores frecuentemente reportan amplias diferencias en las concentraciones tóxicas para la misma especie; este trabajo no ha sido la excepción, pues las  $CL_{50}$  y  $LT_m$  aquí obtenidas no concuerdan con las encontradas en otros estudios.



Los valores de  $LT_m$  y  $CL_{50}$  para 96 hr encontrados en una gran cantidad de trabajos, fluctúan desde 0.6 mg/l hasta valores mayores de 100 mg/l, en varias especies de peces incluyendo *C. carpio* y algunos invertebrados, con bases activas y detergentes aniónicos similares a los probados en este estudio (Abel, et al, 1975; Cairns et al, 1962; Arthur, 1970; Henderson et al, op.cit.; Jong, 1964, Katz et al, 1971; Kenneth et al, 1971; López op. cit.; Marchetti, op. cit.; Marchetti, op. cit.; Margaritis and Creese 1979; Pickering, 1966; Pickering et al, 1983; Reiff et al, 1978; Swisher et al, 1964; Thatcher, 1966), tal diferencia de resultados puede ser debida a uno o varios factores que se mencionan a continuación:

Las especies usadas para experimentación fueron distintas, en algunos casos a la usada en este trabajo. Debido a que las  $CL_{50}$  aquí obtenidas para *C. carpio* son mayores a las reportadas, es posible suponer que esta especie es más resistente a detergentes e ingredientes activos que las usadas en otras investigaciones como *S. gairdneri*, *T. melanopleura*, *Pimephales promelas*, etc. (Flores, op. cit.; Henderson, et al, op. cit.); en los trabajos en los que se usaron carpas, se obtuvieron los  $CL_{50}$  ó  $LT_m$  más elevadas (Thatcher, op. cit.; Flores, op.cit.).

Thatcher considera que cuando se evalúa el efecto potencial de un contaminante, la susceptibilidad de las especies a este tóxico es variable. Por lo anterior, es recomendable someter

diferentes especies de peces para evaluar el efecto tóxico de los mismos detergentes y surfactantes bajo iguales condiciones de laboratorio.

Los detergentes formulados y/o bases activas usadas, también fueron distintas en muchos de los casos; si bien se probaron productos similares: detergentes aniónicos, biodegradables y no biodegradables, no se probaron con la misma especie o vice versa.

Un problema muy grave que existe con respecto a los detergentes es que difieren de la mayoría de los tóxicos en que un nombre puede englobar a un gran número de compuestos por la gran cantidad de isómeros que contienen, por ejemplo el ABS tiene 80 000 isómeros en escala de  $C_{10}$  a  $C_{15}$  y tan solo  $C_{12}$  tiene 3057 isómeros, pero aún, la naturaleza precisa de la muestra puede no ser conocida ni siquiera por su fabricante (Abel, op. cit.; Swicher, 1963).

También es de tomarse en cuenta que bajo condiciones de prueba, los detergentes se pueden concentrar a los lados de las peceras, en la interface aire-agua o bien en la superficie expuesta del pez, lo que trae como consecuencia una diferencia en la toxicidad del producto aún cuando se aplique la misma concentración; hecho que seguramente se presentó en este tra-

jo, debido a que se observaron algunas peceras en las que el detergente estaba prácticamente "pegado" al fondo o a los lados, además de que se observó abundante presencia de mucus en epidermis y branquias en los peces que murieron más rápidamente.

El carácter múltiple de los detergentes mencionado en los párrafos anteriores explica muchas de las variaciones en los resultados reportados, sin olvidar también que la marca del surfactante, contenido y porcentaje de aditivos varían en los diferentes productos aún cuando éstos tengan la misma denominación.

La configuración de la molécula de detergente influye grandemente en la toxicidad, algunos autores han reportado que ésta se incrementa conforme aumenta el número de átomos de carbono (Abel, op. cit.; Martínez, op. cit.), desgraciadamente no siempre se puede saber cuántos átomos de carbono posee el tóxico probado, ya sea por falta del equipo apropiado o de otros recursos, de cualquier forma los detergentes deben ser descritos tan ampliamente como sea posible: longitud y naturaleza de la cadena de hidrocarburos, fuente y marca y cuando se trate de detergentes formulados especificar los otros constituyentes y sus cantidades pues éstos también influyen en la toxicidad del producto en mayor o menor medida. Los detergentes pueden tener el mismo nombre pero su comportamiento puede

ser absolutamente diferente como ya se mencionó anteriormente.

Otro factor de gran importancia es que a pesar de que el bioensayo es una metodología estandarizada, existen una serie de modificaciones que hacen los autores de acuerdo con el tóxico a probar, así, algunos usan oxigenación (sugerida por Peltier, 1978) y otros no, o bien la usan solo al principio del experimento, y no durante todo su desarrollo.

En este trabajo, los bioensayos se realizaron con aereación artificial ya que es factor determinante, porque sin él se estaría evaluando un efecto indirecto de los detergentes activos y los peces morirían por la anoxia ocasionada por falta de oxigenación y no por la provocada por los tóxicos al reducir la tensión superficial. Para evitar el uso de oxigenación artificial, sería necesario disminuir la concentración del tóxico quizá hasta aquellas mencionadas por otros autores. También debe tomarse en cuenta que la aereación artificial podría facilitar la degradación del producto oxidándolo, con lo que su toxicidad disminuiría, especialmente en el caso de los productos poco estables, razón por lo que tal vez en este caso las  $CL_{50}$  evaluadas resultaron más altas a las reportadas.

Otro factor a considerar es la talla de los individuos sometidos a prueba, que en algunos casos no se menciona y que sin

embargo tiene gran importancia, pues la sensibilidad a los de ter gen tes e ingredientes activos varía con respecto a la talla y peso del organismo sometido a prueba (López Z., op.cit.) así como de la etapa del ciclo de vida en que se encuentre (Abel, op.cit.).

Hokanson y Smith (1971) observaron que los peces son capaces de aclimatarse a los detergentes; esta aclimatación seguramente debe estar de acuerdo con la resistencia del pez, dada por la especie probada o bien por la etapa del ciclo de vida del organismo. Este hecho bien pudo haber ocurrido en el presente estudio, pues como se observa en la Tabla XII, la  $CL_{50}$  se hace casi constante a partir de las 24 hr para los tres detergentes, sin olvidar los efectos ejercidos por la biodegradación y estabilidad de los detergentes mencionadas anteriormente.

Un factor ambiental también puede modificar la toxicidad del producto, ya sea, afectando a los organismos prueba, sensibilizándolos al tóxico o bien modificando el estado químico del producto o ambos. Los factores fisicoquímicos como dureza, salinidad, temperatura y alcalinidad influyen directamente en la toxicidad; varios autores han encontrado que los detergentes son más tóxicos en aguas duras que en blandas (Tovell et al, 1975; Lang, 1965).

Hokanson y Smith (1971) consideran que la dureza del agua es la variable ambiental más significativa, pudiendo ser minimizada con una mezcla heterogénea de detergentes la cual no es influenciada por la dureza. Este hecho concuerda solo para el detergente MIXTO<sub>F</sub> en donde no hay gran diferencia entre éste y el testigo, sin embargo para el ingrediente activo MIXTO si se observa una disparidad con el testigo, por lo que se hace evidente la influencia de los aditivos.

La información que hay respecto a la influencia de la temperatura y salinidad es escasa, se ha visto que a mayor temperatura la toxicidad disminuye; la salinidad es un factor que deberá ser más estudiado en relación al "stress" osmoregulatorio en la acción tóxica.

Martínez et al, consideran que algunos compuestos aditivos como el sulfato de amonio no son tóxicos para peces, pero cualquier sal a 9000 ppm en aguas blandas y 13000 en aguas duras causaría que los peces de agua dulce sucumbieran debido a efectos osmóticos.

Como puede observarse es necesario que en estudios de este tipo se especifique la caracterización fisicoquímica del agua usada o bien se señalen los parámetros fisicoquímicos evaluados.

Como ha podido notarse son muchas las causas que influyen en la toxicidad de los detergentes ocasionando variabilidad en los resultados, estos factores no pueden ni deben aislarse ya que interactúan entre sí para dar resultados diferentes en cada estudio de ahí que las amplias diferencias sean debidas a que los factores bióticos y abióticos que afectan la toxicidad no han sido estandarizados, de tal manera que la comparación de resultados se hace virtualmente imposible.

A pesar de que los valores que evalúan la toxicidad obtenidos en este trabajo son muy distintos a los reportados por otros autores, se encontró una gran similitud: los detergentes biodegradables son más tóxicos que los no biodegradables (Pickering, op. cit.; Thatcher y Santner, 1967; Swicher et al, op. cit.; Abel, op. cit.; Hokanson y Smith, op. cit.).

La toxicidad de los surfactantes del tipo  $ABLS_F$  y  $ABLS$  se ve compensada precisamente por su biodegradabilidad, es decir, que los residuos de este tipo de detergentes que sean descargados al drenaje al ponerse en contacto con una gran variedad de microorganismos, capaces de degradarlos, van a ser mucho más rápido desdoblados en compuestos más simples que los detergentes del tipo  $DBS$ , que aunque también se degradan, se consideran inadecuadamente por tener un porcentaje de biodegradabilidad menor del 80% (Montes de Oca, op. cit.).

La adecuada biodegradación del ABL<sub>S</sub> y ABL<sub>S</sub><sub>F</sub> provoca que antes de llegar a los cuerpos receptores finales (ríos, lagos, etc.) ya se hayan descompuesto en otros productos más simples. Sin embargo, está sujeto a discusión y a otras investigaciones el carácter tóxico de los compuestos originados de la degradación primaria y el tiempo en el que se lleva a cabo la biodegradación hasta ser terminal.

Las respuestas manifestadas por los peces ante el efecto de los surfactantes son de gran ayuda en estudios como éste, especialmente por la gran cantidad de variables que existen, las observaciones realizadas al respecto ofrecen un gran apoyo en la interpretación de resultados y se sugiere que sean incluidas en trabajos en los que se efectúen este tipo de pruebas.

El boqueo continuo, los movimientos rápidos e incesantes de aletas pectorales así como el lento desplazamiento de los peces, son signos presentes en igual proporción en todos los de tergentes (ver Tabla XV), estos síntomas, particularmente el primero, manifiestan posiblemente la falta de oxígeno, pues una de las características de los mencionados productos en so lución es la de reducir la tensión superficial del agua impidiendo así la captación de oxígeno. La posible angustia respiratoria fue más evidente durante las horas iniciales de exposición, los peces que sobrevivieron más de las 24 hrs, espe



cialmente en MIXTO<sub>F</sub> y los tres ingredientes activos, se recuperaron mostrando un comportamiento casi normal durante el bioensayo.

El síntoma que se presentó con mayor discrepancia entre los productos tóxicos fue el de la presencia de mucus en epidermis y branquias, este hecho es de gran importancia debido a que otra de las propiedades que los detergentes tienen en común es la tendencia a concentrarse en superficies, ésta no uniforme distribución del tóxico en solución no ha sido suficientemente estudiada (Abel, op. cit.).

Algunos autores mencionan la importancia de considerar la concentración del tóxico en la superficie de la branquia más que en el agua.

Como puede observarse en la tabla de sintomatología de C. carpio los surfactantes que tuvieron un mayor porcentaje de presencia de ~~moco~~ fueron precisamente los productos más tóxicos, por lo que es importante tomar en cuenta que la concentración del tóxico puede perderse sin ejercer su efecto cuando no se adhiere en la superficie del pez, especialmente cuando el detergente es inestable.

Hokanson y Smith reportan que el mucus desprendido se incre-

menta conforme aumenta la concentración del detergente y tiempo en *Lepomis macrochirus* usando LAS, esto no coincide con lo observado en el presente estudio ya que la presencia de mucus fue evidente únicamente durante las dos primeras horas del experimento, hecho que posiblemente se relacione con la resistencia del pez o con la pureza del surfactante.

El resto de los síntomas observados están presentes en igual proporción en los tres tipos de detergentes/ingredientes activos, coincidiendo con los reportados por Hokanson y Smith (1971), lo que hace suponer que son respuestas que se presentan en general por la acción de un tóxico sin ser específicas para surfactantes.

La pérdida del tóxico durante el desarrollo de bioensayos ya ha sido reportada por algunos autores (Abel, op. cit.), por lo que es muy importante que los resultados esten basados en mediciones de los efectos causados, más que en concentraciones calculadas, de ahí la importancia de los estudios histológicos como una medida cualitativa de toxicidad y de apoyo en los bioensayos, pues como se observa en los resultados de histología obtenidos en el presente trabajo, es más el tipo de detergente que la concentración lo que marca una mayor o menor toxicidad.

Hara et al, 1978 y Abel, op cit, consideran que existe más de un modo de acción de los detergentes: remoción de moco, desnaturalización y solubilización de protefnas, alteración en la permeabilidad de la membrana así como de las características de transporte y la reducción de la tensión superficial del agua.

Resulta difícil saber cuál de estos mecanismos es o son los causantes de la muerte de los peces por efecto de los detergentes, sin embargo los estudios histológicos proporcionan amplia información y contribuyen al esclarecimiento de las posibles causas de muerte de las carpas en este estudio, ya que sin ellos sería imposible pretender dar una u otra probable explicación.

Sin duda alguna, los efectos provocados en las branquias son los que proporcionan mayor información, por ser órganos que se encuentran directamente expuestos a la solución del tóxico.

Como es sabido, los detergentes son agentes de superficie activa que modifican la tensión superficial del agua, impidiendo así, la captación de oxígeno; la entrada de este elemento también se ve afectada por la formación de espuma. Partiendo de este hecho, es posible suponer que los peces mueren por asfixia, provocada por la falta de oxígeno; sin embargo el papel de

La reducción de la tensión superficial como causa directa de la muerte de los peces ha causado gran controversia, debido a que algunos estudios han revelado que los peces pueden también asfixiarse cuando son sometidos a sustancias que no son de superficie activa o bien que la modifican de manera insignificante. (Abel, op. cit.).

Las fotografías que se presentan en este estudio, así como todas las analizadas, son prueba fehaciente de la magnitud de los daños causados por los detergentes, particularmente en branquias y muy especialmente para el biodegradable, lo que hace suponer que la muerte de los peces va mucho más allá de una simple reducción en la tensión superficial del agua.

Los daños branquiales traen consigo disturbios en la actividad respiratoria, provocando que los peces mueran por la asfixia ocasionada por la baja eficiencia; la presencia de eritrocitos, en mayor o en menor cantidad, es posible interpretarla como una forma de acelerar el suministro de oxígeno, de ahí su abundante presencia en aquellos peces que se sometieron al detergente más tóxico.

La asfixia provocada por el daño a branquias puede no ser la única causa de muerte de los organismos usados, debe tomarse en cuenta el papel osmoregulatorio de las branquias y el efec

to tóxico que pueden ejercer las sales presentes en los otros componentes de los detergentes, además de los ingredientes activos, tomando en consideración que los detergentes formulados resultaron ser más tóxicos que los ingredientes activos.

La exfoliación de las células epiteliales y de las pilares puede ser debida a dos causas: Algunos autores reportan que el desprendimiento epitelial puede ejercer un efecto de protección al incrementarse la distancia de difusión dificultando así el paso del tóxico, cabe mencionar que los autores no contemplan que este posible efecto de protección podría llevarse a cabo a costa de la eficiencia respiratoria; en el caso particular de este estudio, se observó también que además del desprendimiento epitelial, las células pilares también se exfolian.

Otra explicación y posiblemente la que más concuerda con lo observado en este estudio, es la sugerida para otros tóxicos por Hibiya, 1982, quien propone que el mencionado daño es consecuencia de la dilatación de los capilares debido al aumento en el número de eritrocitos, provocándose una congestión. El aumento del lumen capilar fue un daño que se presentó de manera frecuente (lámina 9), es posible que tal dilatación ocasionara compresión en las células circundantes dando como resultado su exfoliación.

Las secreciones mucosas de branquias y epidermis fueron respuestas observadas ante la acción de los surfactantes (Tabla XI); estas secreciones concuerdan con aquellas producidas por las glándulas mucosas (lámina 13) que posiblemente surgen como respuesta a la solubilización de grasas provocada por los detergentes, para evitar la sequedad.

No obstante, en los cortes de láminas branquiales que fueron tratados con  $ABLS_F$  no se observaron descargas de las glándulas mucosas pero sí secreciones mucosas de branquias y epidermis, este hecho aparentemente contradictorio puede no serlo si se toma en cuenta que los cortes histológicos no se realizaron en el momento en que se observó la presencia de mucus, sino hasta que ocurrió la muerte del pez, tiempo durante el cual el detergente ya había destruido las glándulas mucosas, incluso toda la lámina branquial.

La descarga de las glándulas mucosas no es comunmente reportada en los estudios histológicos de toxicidad en branquias (Abel, op. cit.).

El uso de detergentes como desnaturalizantes y solubilizantes de proteínas es común en estudios bioquímicos o celulares, se ha visto que cuando el detergente está presente en forma de micelas tienen la propiedad de solubilizar la materia orgáni-

ca. Es posible que este modo de acción de los productos probados haya ocurrido para la concentración más elevada del detergente más tóxico, en donde se observó la casi total destrucción de la lámina branquial (Láminas 9 y 10).

La degradación progresiva (Hibiya, op. cit.) manifestada por la proliferación de células interlamelares llenando los espacios de las laminillas branquiales, ha sido reportada para concentraciones más bajas a las usadas en este estudio y se presentó únicamente para el MIXT<sub>0F</sub>, este detergente fue el menos tóxico, por lo que es posible suponer que el daño se manifieste como una respuesta inicial al efecto de los detergentes o bien para concentraciones bajas, es probable que el mencionado efecto también pueda observarse para los otros detergentes, pero en tiempos iniciales de exposición, perdiéndose a medida que continúa el desarrollo del experimento. También, es posible pensar una respuesta a la inversa, si se llegara a aumentar el tiempo de exposición o bien la concentración del detergente MIXT<sub>0F</sub>.

En la mayoría de los estudios histológicos de toxicidad por detergentes se reportan daños en el epitelio branquial, principalmente, en células pilares y en capilares, ocasionalmente se mencionan descargas de glándulas mucosas y presencia de linfocitos; sin embargo la abundancia de eritrocitos y la prolifera

ción de condrocitos son daños que no han sido reportados por otros autores. Se ha mencionado una posible explicación de la presencia de eritrocitos como transportadores de oxígeno; sin embargo, es muy difícil darla para la proliferación de condrocitos, es posible que ésta respuesta surja como una medida de protección por la pérdida de estas células; de tal manera que se inicia una multiplicación desordenada de las mismas, se observó que esto ocurre principalmente cuando los eritrocitos han invadido al cartílago. De cualquier forma son necesarios más estudios al respecto, en donde se observe la evolución del daño, por lo que se sugieren estudios histológicos a diferentes tiempos de exposición de los peces sin esperar su muerte, de tal manera que se pueda observar cual es el momento y los factores que involucran la mencionada proliferación.

Es sabido que las sustancias disueltas en el agua pueden pasar al torrente sanguíneo a través de las branquias, la penetración varía según el grado de disociación del compuesto; sin embargo la ruta de absorción, metabolismo y excreción de los detergentes no ha sido suficientemente estudiada.

Tovell et al, 1975, sugieren que una vez que el detergente ha entrado al torrente sanguíneo, éste se distribuye por todos los tejidos del organismo, absorbiéndose y metabolizándose en



el hígado, los productos metabolizados son regresados a la circulación o secretados dentro de la vesícula biliar, aquellos que regresaron al torrente sanguíneo son excretados por el riñón. Estos autores mencionan que no debe excluirse la posibilidad de que también exista excreción vía alimentaria.

De acuerdo con lo anterior, la posibilidad de encontrar daños en riñón y en el hígado de los organismos usados es grande, como se observó en el presente trabajo.

Lang, 1965, menciona que los daños observados en hígado y riñón no fueron considerables, mientras que López et al, 1979 no observó disturbios en los cortes histológicos realizados del sistema digestivo y glándulas anexas. La severidad de los daños encontrados en este estudio es posiblemente debida a las altas concentraciones usadas de detergente en comparación con las usadas en los trabajos anteriores.

Los riñones contribuyen a la eliminación de las sustancias tóxicas presentes en la sangre. Según Leynaud, 1979 no hay intoxicación siempre que esta eliminación sea tan rápida como la entrada de sustancias tóxicas.

Considerando los daños ocasionados por los detergentes, no se está lejos en suponer que el riñón pierde completa o casi com

pletamente su función como órgano excretor, especialmente con los detergentes  $ABLS_F$  y  $DBS_F$ , prueba de ello es la oclusión, total o parcial, de los túbulos renales que impiden la eliminación del tóxico o de sus productos metabólicos, o bien se hace poco eficiente al disminuir la velocidad de salida con la reducción de la luz tubular.

La pérdida de los límites celulares en los tubos renales y de definición tubular podría resultar como una consecuencia de la oclusión, concentrándose y reabsorbiéndose de esta manera el producto a ser excretado. Sin embargo, podría ser que la acumulación de ciertos materiales como glioproteínas fueran las responsables de la pérdida de luz tubular y que estas causarían necrosis y una gradual destrucción de las células epiteliales, perdiéndose posteriormente la definición tubular.

Se cree que la presencia de glicoproteínas puede ser ligada a un mal funcionamiento de los glomérulos. Este tipo de degeneraciones tubulares han sido reportadas en carpas tratadas con aloxan (Hibiya, op. cit.).

Desafortunadamente no se puede asegurar con la técnica de coloración usada en este trabajo, si las glicoproteínas son o no, las causantes de la reducción del lumen y de la necrosis observada en las células epiteliales. Estos materiales se co-

lorean con eosina y PAS (Hibiya, op. cit.).

La observación de corpúsculos renales en los cortes de riñón no fue posible para los detergentes  $ABLS_F$  y  $MIXTO_F$ , misma que hubiera resultado de gran ayuda, sobretodo para observar si el daño de los corpúsculos renales está relacionado con la oclusión tubular y necrosis epitelial o viceversa. Por lo que se sugiere que este órgano se estudie más ampliamente, realizando cortes histológicos a diferentes niveles (segmento distal, proximal y ducto colector).

Una de las funciones que tiene el hígado es la desintoxicar al organismo, metabolizando los productos nocivos, por lo que los daños provocados a éste van a repercutir en un mal funcionamiento.

Se ha reportado que la acumulación de grasas y de glicógeno, que se observan como vacuolizaciones en el citoplasma, son respuestas típicas ante la presencia de tóxicos, los métodos de inclusión en parafina y de coloración con hematoxilina-eosina ocasionan precisamente esta apariencia, por esta razón no se incluyó en la Tabla XIX vacuolización de citoplasma como daño causado por efecto de los detergentes.

Si las vacuolizaciones en citoplasma son ocasionadas por gli-

cógeno, es muy probable que éste sea el causante de la necrosis de hepatocitos con la consiguiente pérdida de los cordones hepáticos.

La gran cantidad de eritrocitos es probablemente debida al rompimiento de los sinusoides, causado por congestión de las vías que transportan el flujo sanguíneo desde respuestas iniciales en las branquias.

Las alteraciones mencionadas en los párrafos anteriores son pruebas evidentes del acentuado daño ocasionado por los compuestos evaluados, trayendo como consecuencia una baja eficiencia para metabolizarlos y secretarlos a vesícula biliar o al torrente sanguíneo.

Debido a que la vesícula biliar también juega un papel importante en la desintoxicación, se sugieren hacer estudios histopatológicos en este órgano, así como en la epidermis por estar en contacto directo con los productos tóxicos que se encuentran en solución.

Una observación que es importante comentar es que en los tres órganos estudiados y con los tres detergentes evaluados incluyendo los testigos, se observó la presencia de un precipitado de origen desconocido cuyo color se encuentra entre verde se-

co y café amarillento. Este precipitado se hizo más evidente a altas concentraciones distribuyéndose de manera irregular en branquias y riñón (láminas 5, 6 y 12) y en forma redondeada en hígado (lámina 19). El posible origen podría conocerse usando técnicas histoquímicas como las sugeridas por Hinton et al, 1973, las cuales se consideran fuera de los objetivos de este estudio.

A pesar de que este trabajo proporciona una amplia información con respecto a la toxicidad de los detergentes evaluados, no es posible extrapolar los resultados a condiciones naturales, por tal motivo, tampoco se puede recomendar o dejar de hacerlo, un cambio en la formulación de los detergentes que se fabrican en nuestro país.

Es necesario que se tomen en cuenta otros factores que existen en condiciones naturales. Los desechos que son arrojados a los cuerpos de agua, entre ellos los detergentes, son eliminados de manera casi ininterrumpida a los cuerpos de agua por lo que se sugiere que se realicen bioensayos de flujo continuo "IN SITU", utilizando diferentes especies de peces y otras de distintos niveles tróficos, así como en diferentes etapas del ciclo de vida, ya que la susceptibilidad a los detergentes varía de acuerdo con la especie seleccionada y con la etapa del ciclo de vida. Flores et al, op. cit., encontraron que la

movilidad del esperma de charal se ve afectada con la presencia de detergentes, además de que la eclosión de los huevos se ve acelerada.

No debe olvidarse que otros compuestos químicos o elementos como  $Cu^{++}$  y  $Hg^{++}$  presentes en aguas naturales pueden potenciar el efecto tóxico de los detergentes, (Henderson, op. cit.; Sprague, 1970; Margaritis et al, 1970).

Banerji, op. cit, encontró que la combinación parathion-surfactante produce efectos sinérgicos, así como con aceite combustible, pesticidas e insecticidas (Hokanson, et al, op. cit.).

Debe tomarse en cuenta que la toxicidad del producto puede agudizarse con un incremento en la dureza y una disminución de la temperatura, mismos que pueden modificarse por la presencia de otros compuestos.

Se recomienda también hacer estudios de toxicidad crónica o subletal de los productos tensoactivos. Existen varios estudios en los que se observa que a bajas concentraciones, los detergentes modifican la respuesta olfativa, dañan los quimio receptores disminuyendo así la capacidad de buscar alimento o bien de huir de los enemigos, etc. (Hara et al, op. cit.; Bar

dach et al, 1965). En este estudio se observó que los peces que no murieron durante los bioensayos, difícilmente se recuperaron, ya que fueron muy susceptibles a otras enfermedades, principalmente a las ocasionadas por protozoarios, concordando con lo reportado por Cairns et al, 1962.

El cambio de detergentes no biodegradables a biodegradables puede ser posible, como lo ha sido en otros países, si se toman en cuenta los factores mencionados y las condiciones de nuestro país. De cualquier forma, se sugiere también profundizar en el estudio de otro tipo de detergentes, como los no iónicos que en algunos países desarrollados ya se empiezan a introducir al mercado de los detergentes domésticos (European News) y que algunos autores reportan que son menos tóxicos como el *Triton X-100* y el *polyoxietilen ester*, comparativamente con los aniónicos (Hara et al, 1978; Henderson et al, op. cit.) sin embargo tienen el problema de que su costo de producción es más elevado que el de los aniónicos.

Por último, Margaritis et al, 1970 sugieren el uso de biosurfactantes (producción de surfactantes por medio de microorganismos) quienes resultan ser menos tóxicos que los detergentes sintéticos, además de tener un costo mucho más bajo. Resultaría muy interesante ahondar en el estudio de este tipo de surfactantes.

## 5.0 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio son una medida de toxicidad aguda de los ingredientes activos y de sus detergentes formulados comerciales, evaluados en este trabajo para 96 hr de exposición en *Cyprinus carpio*, más no como un índice de sobrevivencia en peces por tiempos indefinidos.

Los resultados de este trabajo no pueden ser extrapolados a condiciones naturales ambientales debido a que fueron realizados bajo características de laboratorio.

Las variaciones en los parámetros fisicoquímicos fueron ocasionadas por la presencia de los detergentes formulados e ingredientes activos.



Cuantitativamente y en orden decreciente la toxicidad de los detergentes formulados está dada de la siguiente manera:

ABLS<sub>F</sub>, DBS<sub>F</sub> y MIXTO<sub>F</sub>.

La toxicidad de los ingredientes activos sigue el siguiente orden de mayor a menor: ABLS, DBS y MIXTO.

Los detergentes formulados comerciales son más tóxicos que los ingredientes activos, por las sales y aditivos que contienen.

De acuerdo con la categorización tóxica el ABLS<sub>F</sub> y el ABLS son igualmente tóxicos (categorización: "Toxico") asimismo el DBS<sub>F</sub> y MIXTO<sub>F</sub> (categorización: "Moderadamente tóxico").

Los detergentes y/o bases activas usadas deben ser descritos lo más ampliamente posible: *longitud de la cadena de hidrocarburos*, fuente y marca del producto, tipo y cantidad de los demás constituyentes de los detergentes.

La gran variabilidad de los detergentes hace que las comparaciones con otros estudios de toxicidad sean casi imposibles.

La sintomatología presentada por los peces durante el desarrollo de los bioensayos son manifestaciones de posibles disfun-

ciones internas, como la falta de oxígeno, mostrada con el boqueo continuo.

Los estudios histológicos proporcionan amplia información en el esclarecimiento del modo de acción de los surfactantes.

Cualitativamente el detergente más tóxico es el  $ABLS_F$  por haber causado daños más severos en branquias, hígado y riñón, siguiendo en orden decreciente el  $DBS_F$  y  $MIXTO_F$ .

Las branquias son los órganos más afectados por la acción de los detergentes debido a su casi total destrucción.

La principal causa de muerte en los peces es la asfixia ocasionada por una baja eficiencia respiratoria.

El daño común para los tres órganos fue la invasión de eritrocitos y linfocitos.

Los daños que no se reportan en otros estudios histológicos por efecto de detergentes son: invasión de eritrocitos, proliferación de condrocitos, desintegración de láminas branquiales así como de tejido conjuntivo, oclusión de túbulos renales, pérdida de límites celulares en epitelio tubular renal, condensación de cromatina en núcleos renales, pérdida de defi

nición de hepatocitos y de cordones hepáticos.

El detergente biodegradable es más tóxico que el no biodegradable, sin embargo, la alta toxicidad del detergente ABLS<sub>F</sub> se ve compensada por su biodegradabilidad.

Se considera que este estudio no es determinante para recomendar el cambio de formulación de detergentes no biodegradables o biodegradables, debido a la necesidad de realizar estudios subletales, IN SITU, con diferentes especies de peces y etapas del ciclo de vida, así como con distintos niveles tróficos y velocidades de biodegradación entre otros.

## 6.0 BIBLIOGRAFIA

ABEL, P.D., 1974. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates, *J. Fish. Biol.* 6:279-298.

ABEL, P.D., and J. SKIDMORE, 1975. Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. *Water Research.* 9:759-765.

APHA, AWWA, WPCF., 1982. *Standard methods for the examination of water and waste water.* APHA-AWWA-WPCF. Ed. 15, Washington. D1345-59. 212-221.

ARTHUR, J.M., 1970. Chronic effects of linear alkylate sulfonate detergent on *Gammarus pseudolimnaeus*, *Campelema decisum* and *Physa integra*. *Water Research.* 4:251-257.

BANERJI, K., 1970. Detergents. *J. WPCF.* 42(6):916-920.

BARDACH, J.E., M. FUJIYA and A. HOLL, 1965. Detergents effects on the Chemical Senses of the fish *Ictalurus natalis* (Le Sueur) *Science.* 14:1605-1607.

BROMAGE, N. and A. FUCHS, 1976. A histological study of the responses of the interrenal cells of the Goldfish (*Carassius auratus*) to the treatment with sodium lauryl sulphate. *J.*

*Fish Biol.* 9:529-535.

BROWN, V., F. ABRAM and L. COLLINS, 1978. The acute lethal toxicity to rainbow trout of LAS surfactant and of its residues and degradation products. *Tenside Detergents*. 15(2): 57-59.

CABRIDENC, R., La polución de las aguas por los detergentes. IN: Pesson, P. (mundi-Prensa). *La contaminación de las aguas continentales*, 1979: 45-62.

CAIRNS, Jr. and A. SCHEIER, 1962. The acute and chronic effects of standar sodium alkyl benzene sulphonate upon the Pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus* (Linn) and the bluegill sunfish *L. macrochirus* Raf. 17 th Industrial Waste Conference Purdue. Engng. Exten. Sr. II2:14-28.

Comitee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, 1975. *Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians*. EPA-660/3-75-009. National Technical information service.

CUBILLAS, B. y G. DIAZ, 1982. *Manual de Bioensayos*. Subdirección de planeación. Dir. Gral. de Protección y Ordenación Ecológica, CIECCA.

EISLER, R., G. GARDNER, R. HENNEKEV, G. LA ROCHE, D. WALSH and YEVICH, 1972. Acute toxicology of sodium nitriloacetic acid (NTA) and NTA-containing detergents to marine organisms. *W. Research*. 6: 1009-1027.

ERICHSEN, J., 1964. *Fish and river pollution*. Butter woths & Co. Washington, 185 p.

ESTRADA, E., L. PERALTA y P. RIVAS. 1982. *Manual de técnicas histológicas*. AGT Editor. México, 140 p.

EUROPEAN CHEMICAL NEWS, 1971. Non-ionics surfactant production will near anionics level by 1980. Marketing information.

FLORES, F., B. ELIAS, M. CELIS, B. BERMUDEZ y C. TORRES, 1978. *Estudio del impacto de los detergentes en el Recurso Hidráulico*. 6a. Etapa. Proyecto 7198. Instituto de Ingenieria, UNAM.

GUTIERREZ, E. y B. CUBILLAS, 1980. *Caracterización tóxica de tres industrias del Valle de México, mediante bioensayos estáticos con renovación cada 24 horas utilizando a *Cyprinus carpio**. S.A.R.H.

HARA, T. y B. THOMPSON, 1978. The reaction of whitefish, *Coregonus clupeaformis*, to the anionic detergent sodium lauryl sulphate and its effects on their olfactory responses. *Water Research*. 12: 893-897.

HENDERSON, C., O.H. PICKERING and J.M. COHEN, 1959. The toxicity of synthetic detergents and soaps the fish. *Sewage and Industrial wastes*. 31(3): 295-306.

HIBIYA, T. 1982. *An atlas of Fish Histology*. Normal and Pathological Features. Kodansha Ltd. Tokyo, 147 p.

HINTON, D.M. KENDALL y B. SILVER, 1973. Use of Histologic and Histochemical Assessments in the Prognosis of the effects of aquatic pollutants. IN: Cairns, J. and K. Dickson, *Biological methods for the assessment of water quality*. Mem. LXXV Annual Meeting American Society for testing and materials. Jun 26-29, 1972: 194-208.

HOKANSON, K.E. and L. SMITH, 1971. Some factors influencing toxicity of Linear Alkylate Sulphonate (LAS) to the bluegill. *Trans. Amer. Fish Soc.* 100(1): 1-12.

JONG, A. 1964. Comportament biológico dei tensioattivi. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*. XLI: 547-549.

- KATZ, M., C. H. WAHTOLA, R.S. LEGORE, D. ANDERSON and S. MCCO  
NELL, 1971. Effects on freshwater fish. *Journal WPCF*. 43(6):  
1334-1363.
- KOSKOVA, L. and V. KOSKOVSKAYA, 1979. Water Toxicology and  
Radioecology. Toxicity of Synthetic Surfactants and detergents  
to aquatic animals. *Hidrobiol. J.* 15 (5): 67-73.
- LANG, V.W., 1965. Untersuchungen zur Wirkungswese von  
anionischen grenzflächenaktiven stoffen auf histologische  
Beschaffenheit und Funktienver Schiedener organ e bei *Carassius*  
*auratus*. *Eingang am. I* (12): 25-45.
- LEON, T.R., 1973. Determinación del contenido de detergentes  
en los cuerpos de agua receptores del área metropolitana de  
Caracas. Implicaciones Sanitarias. *XIV Congreso Interamerica*  
*no de Ingenierla Sanitaria*. 4-9 agosto. Caracas, Venezuela,  
1-28 p.
- LEYNAUD, G., Efectos tóxicos de la polución sobre la fauna  
piscícola. IN: Pesson, P. (mundi-Prensa). La contminación  
de las aguas continentales, 1979: 45-62 p.
- LOPEZ, A., E. ACOSTA, R. MORALES y P. RIEMANN, 1973. *Efectos*  
*de los detergentes sobre los peces y las plantas*. 2da. Etapa.  
Contrato SP/72-C-8. S.R.H.



LOPEZ, A., E. ACOSTA, R. MORALES. 1974. *Efectos de los detergentes sobre los peces y las plantas*. 3a. Etapa. Instituto de Ingeniería, UNAM.

LOPEZ, A., 1979. *Estudio del impacto de los detergentes en el Recurso Hidráulico*. 4a. Etapa. Instituto de Ingeniería, UNAM.

MARCHETTI, R. 1964. *Indagini sulla tossicità di alcuni tensioattivi nei riguardi dei pesci. Delle sostanze Grasse*. XLI: 533-542.

MARCHETTI, R., 1965. *Critical review of effects of synthetic detergents on aquatic life*. *Stud. Rev. Gen. Fish. Coun. Medit.* (26): 1-32.

MARGARITIS, A. y E. CREESE, 1979. *Toxicity of surfactants in the Aquatic Environment: A review*. In: Mee-young, and G. Garguner (Pergamon Press) *Waste Treatment and* 445-462.

MARTINEZ, P., J. ZAMACUNA y G. ORDÓÑEZ, 1971. *Evaluación de los estudios sobre el ABS y el LAS y efectos en la agricultura y la fauna*. Contrato SP-71-C11. S.R.H.

MOHNOT, S.M., 1975. *A review of synthetic detergent*. *Chem. Eng. World*, X (4): 29-40D.

MONTES DE OCA, G.A., 1986. Estudio comparativo de la biodegradación de diferentes surfactantes y sus respectivos productos formulados utilizados como detergentes en México. Tesis Profesional, Esc. Nal. Ciencias Biológicas, IPN, México, 89 pags. 38 tablas, 9 figs. 9 gráficas.

PELTIER, W. 1978. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to aquatic organisms*. EPA. USA.

PICKERING, Q. 1966. Acute toxicity of alkyl benzene sulfonate and linear alkylate sulfonate to the eggs of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Air and Wat. Pollut. Int. J.* 10: 385-391.

PICKERING, Q.H., E.P. HUNT, G.L. PHIPPS, T.H. ROUSH, W.E. SMITH, D.L. SPEHAR, C.E. STEPHAN, and D.K. TANNER, 1983. Effects of pollution on freshwater fish and amphibians. *Journal WPCF*. 55(6): 841-863.

REIFF, B., R. LLOYD, M.J. HOW, D. BROWNS, and J.S. ACALASTER, 1978. The acute toxicity of eleven detergents to fish: results of an interlaboratory exercise. *Water Res.* 13:207-210.

SECRETARIA DE PESCA. 1983. *Piscicultura*. Folleto para la capacitación. 55 p.

SPRAGUE, J., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish II. Utilizing and applying bioassay results. *W. Resch.* 4:3-32.

SPRAGUE, J., 1973. The ABC's of pollutant bioassay using fish. In: Cairns, J. and K. Dickson, *Biological methods for the assessment of water quality*. Mem. LXXV Annual meeting American Society for testing and Materials. Jun 26-29, 1972: 6-30.

STEPHAN, C. and D. MOUNT, 1973. Use of toxicity tests with fish in water pollution control. In: Cairns, J. and K. Dickson, *Biological methods for the assessment of water quality*. Mem. LXXV Annual Meeting American Society for Testing and Materials. Jun 26-29, 1972: 164-177.

SWISHER, R., I.T. O'ROURKE and H.D. TOMLINSON, 1964. Fish bioassays of Linear Alkylate Sulfonates (LAS) and intermediate biodegradation products. *J. American Oil Chemists Society* 41: 746-752.

THATCHER, T.O., 1966. The comparative lethal toxicity of a mixture of hard ABS detergent products to eleven species of fish, *Air and water pollution International Journal*. 10: 585-590.

THATCHER, T.O. and SANTNER, J.F., 1967. Acute toxicity of LAS to various fish species. *Proc. Ind. Waste Conf. Purdue Univ.* 121: 996-1002.

TOVELL, P.W.C. NEWSOME and H. HOWES, 1974. Effect of water hardness on the toxicity of an anionic detergent to fish. *Water Res.* 8: 291-296.

TOVELL, P., A. HOWES y C. NEWSOME, 1975. Absorption metabolism and excretion by goldfish of the anionic detergent sodium lauryl sulphate. *Toxicology*, 4: 17-29.

WAITE, T., 1984. *Principles of water quality*. Academic Press, Inc. Orlando, 86-91.

WELSCH, U. y V. STORCH. 1979. *Estudio comparado de la Citología e Histología Animal*. Urme, S.A. España, 365 p.