

31  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



EVALUACION DEL EFECTO PRODUCIDO POR EL  
D.B.SS, PLOMO, LAURILSULFATO DE SODIO,  
SOLFAC Y PETROLEO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA  
ACETILCOLINESTERASA EN *Moina macrocopa*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**RAFAEL MAQUEDA CEBALLOS**

ASESORÉS: DRA. LAURA MARTINEZ TABCHE  
M. EN C. BEATRIZ RAMIREZ MORA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

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

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de  
Exámenes Profesionales

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

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisa la TESIS TITULADA:  
Evaluación del efecto producido por el D.B.SS, Plomo, Lauril-  
sulfato de sodio, Solfac y Petróleo sobre la actividad de la  
acetilcolinesterasa en Molina macrocopa

que presenta el pasante: Rafael Maqueda Ceballos  
con número de cuenta: 8510826-2 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

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

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

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 23 de Septiembre de 199 4

PRESIDENTE	<u>Dr. Ricardo V. Santiago Díaz</u>	<i>[Firma]</i>
VOCAL	<u>Q.F.B. Maricela Noé Martínez</u>	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	<u>Q.F.I. Leticia Zuñiga Ramirez</u>	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Virginia Oliva Arellano</u>	<i>[Firma]</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Lidia Rangel Trujano</u>	<i>[Firma]</i>

A MIS PADRES.

Por haberme ofrecido su cariño, comprensión y apoyo a lo largo de toda mi carrera como estudiante y haber tenido la confianza y paciencia para lograr este título.

A MIS HERMANOS Y HERMANAS

Que siempre me alentaron y supieron apoyarme en los momentos difíciles para poder salir adelante.

A MIS SOBRINOS.

Miguel Amauri, Dulce María, Miriam  
Rocio, Luis Armando.

A MI ABUELITA.

A MIS AMIGOS:

Los Alfa-Alfa.

Alejandro, Alfredo, Antonio, Agustin,  
Andres, Isauro, Miguel, Mario S, Mario G,  
Mauricio, Jose, Rosario. Por los momentos  
mas agradables que pasamos juntos en la  
escuela y fuera de ella a lo largo de 6  
años.

A LA 15ava DE Q.F.B.

A LA F.E.S. CUAUTITLAN

A MIS ASESORAS:

Dra. Laura Martinez Tabche. Por todo su apoyo para la realización de esta tesis.

M. en C. Betriz Ramirez Mora. Por su apoyo y colaboración en la realización de esta tesis, por su gran amistad, admiración y respeto que le tengo.

Q.F.I. Letricia Zufiga. Por su apoyo en la F.E.S. - C.

A LOS COMPANEROS DEL LAB TOX. ACUAT.

Eliacim, Julieta, Rosa Ma., Paty,  
Carlitos, Lorena, Alejandro, Elena,  
Blanca, Naty.

## INDICE.

1.- Introducción	3
2.- GENERALIDADES	4
2.1. Características de <i>Moina macrocopa</i> .	9
2.1.1. Clasificación taxonómica.	9
2.1.2. Morfología	9
2.1.3. Respiración	12
2.1.4. Alimentación	12
2.1.5. Locomoción	12
2.1.6. Reproducción	13
2.1.7. Diformismo sexual.	13
2.1.8. Ciclo de vida.	14
2.2. Importancia de la <i>Moina macrocopa</i> en pruebas toxicológicas	16
2.3. Acetilcolinesterasa	18
2.4. Petróleo.	21
2.4.1. Toxicocinética.	23
2.4.2. Efectos.	24
2.4.3. Mecanismos de toxicidad	24
2.5. Plomo	26
2.5.1. Toxicocinética.	27
2.5.2. Efectos.	28
2.5.3. Mecanismos de toxicidad	29
2.6. Insecticidas	31
2.6.1. Piretros.	32
2.6.2. Toxicocinética.	33
2.6.3. Efectos.	33
2.6.4. Mecanismos de toxicidad	34

2.7. Detergentes.	35
2.7.1. Toxicología.	37
2.7.2. Efectos.	37
3.- OBJETIVOS	38
4.- MATERIAL Y METODOS.	39
4.1. Cultivo de la M. macrocopa.	36
4.2. Exposición de la M. macrocopa a los xenobioticos.	40
4.3. Evaluación de la actividad de la acetilcolinesterasa.	42
4.4. Determinación de proteínas.	43
5.- RESULTADOS.	45
6.- DISCUSION.	60
7.- CONCLUSIONES.	68
Abreviaturas.	69
Glosario	70
8.- BIBLIOGRAFIA.	71



## 1. - INTRODUCCION

El agua es uno de los compuestos más abundantes y necesarios para la vida de todos los seres vivos, ya que además de formar parte de toda materia viva, tiene múltiples usos en el desarrollo de la vida humana. Sin embargo, el hombre la ha convertido en el vehículo de sus desechos, llegando tarde o temprano a los diferentes cuerpos acuáticos que se encuentra en México, siendo esta las principales causas de contaminación de los mantos acuíferos.

Los efectos producidos en los organismos acuáticos por los diferentes contaminantes son frecuentemente evaluados por su letalidad (CL<sub>50</sub>), sin embargo, los diversos xenobióticos provocan alteraciones bioquímicas y fisiológicas que no siempre culmina con la muerte, es por ello que cobra gran importancia la oportuna identificación del impacto toxico producido por los diversos xenobióticos.

El presente trabajo pretendió desarrollar una técnica que nos permita evaluar la calidad del agua de manera rápida y confiable, utilizando la acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa* como bioindicador del índice de contaminación acuática.

## 2. - GENERALIDADES.

El agua es uno de los compuestos más abundantes en el mundo, siendo este uno de los recursos más preciados, porque además de ser indispensable para todos los seres vivos, forma parte de la materia viva, y es utilizada en casi todas las actividades humanas. (52)

La mayor cantidad de agua en el planeta se encuentra en los océanos y corresponde aproximadamente al 92 % del total. Por otro lado, el agua dulce abarca el 2.8 % encontrándose la mayor en los polos en forma de hielo, el agua dulce disponible en el mundo se encuentra en ríos, lagos, arroyos, manantiales y depósitos subterráneos. (52)

Los usos que el hombre a dado al agua son múltiples, sea como medio de transporte o como base para los alimentos; para riego, para beber; para aseo general ó para la industria; para la generación de energía, ó para fines recreativos. Desafortunadamente, el hombre ha abusado de las aguas del planeta utilizándolas como vehículo de sus desechos, los cuales han provocado la contaminación de la misma y con ello se ha visto afectado paulatinamente los ecosistemas acuáticos. (31, 49, 52)

La contaminación del agua implica la presencia en el ambiente de uno o más sustancias, ó energía que perjudique la vida, la salud y el bienestar humano considerando a la flora y la fauna, o la modificación de la calidad del agua. Las

fuentes de contaminación del agua pueden ser por cambios naturales del medio ambiente o bien por causas antropogénicas. (31, 39, 52, 49)

Las fuentes antropogénicas son causadas por actividades inherentes al hombre y estas pueden ser clasificadas en municipales, industriales, agrícolas y accidentales.

Las grandes ciudades son, por supuesto, una de las principales fuentes de contaminación del agua, debido a la concentración de personas por unidad de Área, que utilizan gran cantidad de este recurso y posteriormente los desechan en forma de aguas negras. Así mismo, del desarrollo de industrias que arrojan efluentes con sustancias químicas, frecuentemente contaminadoras del agua de albañal. Las aguas negras viajan a través de canales las cuales llegan a mezclarse con corrientes naturales y finalmente terminan en los grandes depósitos acuíferos. Tomando en cuenta la hidrología de nuestro país, es evidente que todos los mantos acuíferos reciben diversas cargas contaminantes, tanto de aguas residuales, como de origen industrial. (39, 52)

La contaminación agrícola se puede originar por el uso de plaguicidas y de fertilizantes, los cuales son arrastrados por la lluvia o por aguas de riego hasta los mantos acuíferos. Así mismo por el uso de pesticidas depositados directamente en el agua durante las fumigaciones aéreas, o para controlar plagas acuáticas. (39, 52)

Los efectos adversos producidos por los contaminantes sobre organismos acuáticos son frecuentemente evaluados por

dependiendo de la intensidad y frecuencia de exposición del contaminante. (34, 31, 51)

La utilidad de las respuestas bioquímicas y fisiológicas como bioindicadores para monitoreo de la calidad del agua depende de la habilidad de distinguir cambios sutiles entre una respuesta debida al cambios ambientales y la variabilidad biológica normal de los producidos por los contaminantes. Considerando dentro de la variabilidad biológica diversos factores endógenos, tales como; peso, sexo, edad, condiciones de reproducción, estado nutricional y ritmo biológico entre otros. (51)

Otros objetivos de un buen indicador de toxicidad es que permita recabar información sobre los efectos relevantes a varios niveles de organización biológica, además que estas pruebas sean replicables, reproducibles, rápidas y económicas. Por lo que el desarrollo de bioensayos de laboratorio estandarizados que cumplan con estas características es deseable. (51)

su letalidad. la cual es una prueba fácil de realizar; sin embargo, presenta inconvenientes ya que el efecto tóxico producido por los xenobioticos, no necesariamente culminan con la muerte, pero si pueden alterar a las funciones bioquímicas, como son el anabolismo y catabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos los cuales pueden conllevar a una disminución en el crecimiento, reproducción y producción de los organismos. (35, 43)

Debido a los problemas que se presentan para detectar los impactos producidos por concentraciones subletales de xenobioticos en los organismos de las poblaciones acuáticas, es necesario caracterizar los cambios que pueden presentar en los parámetros bioquímicos y fisiológicos, los cuales puedan ser considerados como indicadores del daño inicial y tiene la capacidad de identificar los problemas antes de que se ejerzan un daño sustancial sobre el ecosistema. (31, 34, 43, 51)

Cuando un contaminante esta presente en el medio ambiente acuático se pueden presentar alteraciones bioquímicas por ejemplo en la actividad enzimática, en los niveles de proteínas y lípidos, activación o inhibición de rutas metabólicas, alteraciones en las propiedades de las membranas, en la composición de tejidos y fluidos del organismo. Estos cambios pueden subsecuentemente afectar algunos de los siguientes procesos fisiológicos, la digestión, el consumo de oxígeno, la conducción del impulso nervioso, la síntesis de hemoglobina, la detoxificación, etc. Todos los cambios bioquímicos pueden ocurrir dentro de un periodo que abarca desde unos cuantos minutos hasta días.

A continuación se mencionan algunos ejemplos de los efectos bioquímicos afectados por contaminantes en organismos acuáticos (38).

Proceso bioquímico	Función fisiológica	Contaminante
<b>Enzimas:</b>		
Acetilcolinesterasa	Transmisión del impulso nervioso	Insecticidas fosforados y carbamatos.
Acido delta amino levulinico deshidrogenasa	Síntesis de Hemoglobina	Mercurio
Función mixta oxidasa	Destoxificación	Compuestos orgánicos, y hidrocarburos aromáticos policíclicos.
Acido tricarbóxico Ciclo enzimático: Fumarasas isocitrato, succinico deshidrogenasa.	Consumo de oxígeno	Pentaclorofenol
Metabolismo de glucosa piruvato kinasa, láctico deshidrogenasa	Metabolismo de la glucosa	Pentaclorofenol
Glutamato-piruvato deshidrogenasa	Metabolismo de lípidos	Pentaclorofenol
Na, K, Mg	Regulación osmótica y iónica.	DDT, Pentaclorofenol
Enzimas de Lisosomas	Daño celular	Metales y contaminantes orgánicos.
<b>Aminoácidos</b>		
Aminoácidos libres taurina:glicina		Cd, Petróleo
Metales pesados unidos a proteínas	Destoxificación	Cd, Hg.
Hormonas esteroides	Reproducción	PCBs
Respuestas Hematológicas	Eleva los niveles de K, Na, Ca, colesterol.	Eldrin.

## 2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA *Moina macrocopa*.

### 2.1.1 CLASIFICACION TAXONOMICA

Phylum	Arthropoda
Clase	Crústacea
Subclase	Brachiopoda
Superorden	Diplostraca
Orden	Cladocera
Suborden	Eucladocera
Superfamilia	Chydroidea
Familia	Moinidos
Género	Moina
Especie	Macrocopa

### 2.1.2 MORFOLOGIA.

La *M. macrocopa*, es un cladóceros macroscópicos; su longitud oscila entre 0.2 y 7 mm. son habitantes de agua dulce y se les conoce como "pulgas de agua".

Su cuerpo es de forma oval, comprimido lateralmente. Presenta un caparazón que encierra a todo el organismo con excepción de la cabeza. El cuerpo se divide en cabeza, tórax y post-abdomen. la cabeza esta más o menos bien definida y se proyecta verticalmente en dirección posterior; presenta cinco partes de apéndices. dos de ellos, son birrámeos y sirven para la locomoción. los restantes corresponden a los pares bucales.

En la cabeza, lateralmente se encuentran un gran ojo compuesto cerca del cual se localiza un ocelo u ojo nauplio.

El tórax se presenta de cuatro a seis segmentos y esta cubierto por un caparazón quinoso, el cual esta constituido por dos valvas firmemente unidas a la pared del cuerpo por el lado dorsal.

el tronco presenta cinco apéndices bien diferenciados, los cuales no estan claramente segmentados.

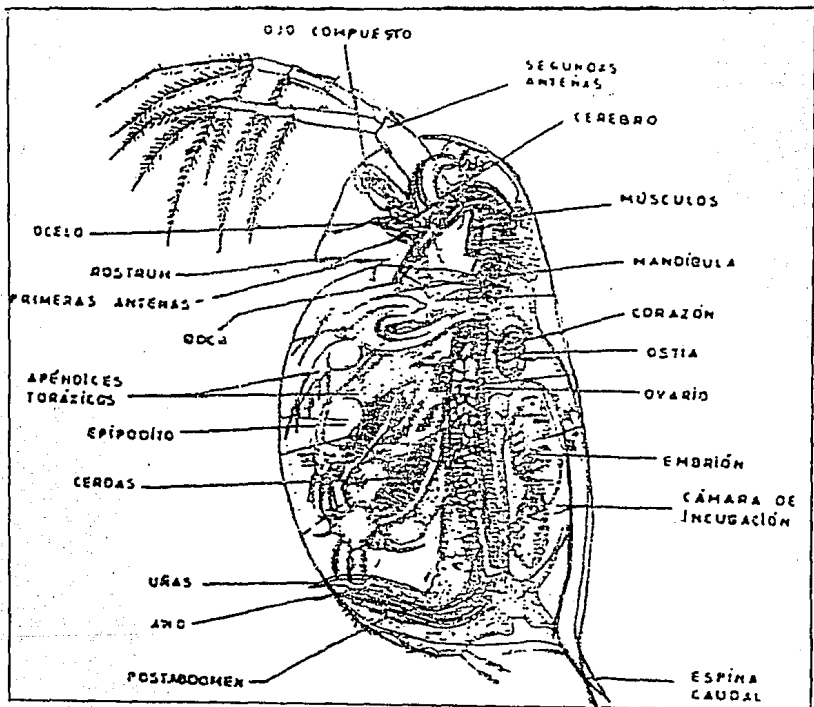
En la parte dorsal del cuerpo de la hembra, entre el caparazón y la pared del cuerpo, se encuentra una cavidad, la cámara de incubación, sitio en el cual se desarrollan los huevos y las crías.

el corazón se localiza en la parte superior de la cámara de incubación: se identifica fácilmente ya que consiste de un pequeño saco con dos aberturas las cuales se encuentran en constante contracción.

El abdomen no presenta apéndices. El orificio genital se encuentra a la misma altura del abdomen.

La parte final del tronco, correspondiente al post-abdomen esta equipado con una uña que corresponde a la furca o espina. (25)





ANATOMIA DE UN MOINIDO

### 2.1.3. Respiración.

La respiración se efectúa a través de los apéndices torácicos, quienes, por su continuo movimiento originan una corriente de agua que permite el intercambio gaseoso. (25)

### 2.1.4. Alimentación.

Los moinidos se alimentan de bacterias, algas unicelulares y material orgánico disuelto. Durante el proceso alimenticio tienen que filtrar gran cantidad de líquidos para retener las partículas alimenticias. Con el movimiento de sus apéndices hacen pasar agua por la abertura del caparazón. El alimento ya filtrado es concentrado en el conducto alimenticio, delimitado por la base de los apéndices en donde se forman los agregados, mediante la secreción del mucus. El bolo alimenticio ya formado, pasa a la boca en donde se inicia la digestión. (25)

### 2.1.5. Locomoción.

La locomoción se lleva a cabo con la ayuda de un segundo par de antenas, el cual es más grande y por lo tanto más potente. Sus movimientos provocan que "salte" a través del agua. El movimiento es en gran medida vertical. El golpe del remo hacia abajo por parte de las antenas, impulsan al animal hacia arriba, después se sumerge lentamente o continua el movimiento en cualquier dirección. (25)

#### 2.1.6. Reproducción.

Los moinidos presentan dos tipos de reproducción: sexual y asexual.

La reproducción sexual se lleva a cabo cuando las condiciones ambientales son adversas, por ejemplo: alta densidad de población, acumulación de productos de deshecho, disminución de la disponibilidad de alimento, bajas temperaturas. Estas condiciones favorecen la presencia de machos y la aparición de los huevos sexuales en envoltorios llamados "EPIPIOS".

Los epipios flotan o se sumergen en el fondo y pueden resistir desecación y congelación. Por medio de los epipios, los organismos pueden dispersarse a ciertas distancias a través del viento o animales.

La reproducción asexual es la más frecuente durante el ciclo de vida de los moinidos, debidos a que las poblaciones estan constituidas fundamentalmente por hembras, las cuales se reproducen por partenogénesis, proceso en el que los huevos se desarrollan sin ser fecundados por los machos. Este tipo de reproducción ocurre cuando las condiciones ambientales son óptimas. Los juveniles que se reproducen por partenogénesis dan origen solamente a hembras con las características morfológicas de las formas adultas. (25)

#### 2.1.7. Dimorfismo Sexual.

Los machos se pueden distinguir por que son de menor tamaño que las hembras, usualmente un tercio del tamaño de

éstas: sus anténulas son más largas por lo tanto, el movimiento es efectuado más rápidamente: presentan modificaciones postabdominal y los apéndices anteriores ostentan un gancho utilizado en la cópula. (25)

#### 2.1.8. Ciclo de vida.

Generalmente el promedio de vida de la *M. macrocopa* es de unos cuarenta días a 25 °C y al rededor de 56 días a 20 °C. En el laboratorio de biología de SEDESOL, se han logrado mantener hembras por más de dos meses a 20 °C  $\pm$  2 °C. El ciclo de vida de *M. macrocopa* incluye cuatro etapas que son: a) huevo, b) juvenil, c) adolescente y d) adulto.

Los huevos se desarrollan dentro de la cámara de incubación y los neonatos son liberados en aproximadamente dos días, cuando la hembra muda. El tiempo necesario para que los juveniles tengan su primer descendencia es entre 6 y 10 días aproximadamente. *M. macrocopa* tiene 4 a 6 estadios.

Cada estadio termina con una muda e inmediatamente después ocurre el crecimiento, cuando el nuevo exoesqueleto aún es elástico.

El periodo adolescente consiste sólo de un estadio en el cual ocurre el completo desarrollo de los huevos dentro del ovario. Generalmente, los huevos son liberados a la cámara de cría minutos después de mudar y las crías en desarrollo son liberadas justo antes de la siguiente muda. Por lo general *M. macrocopa* tiene de 6 a 22 estadios adultos cuya duración aumenta con la edad, pero también depende de

las condiciones ambientales. Cada estadio finaliza con cuatro eventos importantes que son: a) liberación de crías de la cámara de crianza, b) muda, c) aumento de tamaño y d) liberación de una nueva camada a la cámara de crianza.

El número de crías por camada es muy variable ya que ésta depende de las condiciones ambientales y sobre todo de la disponibilidad de alimento. *M. macrocopa* puede llegar a producir entre 6 y 10 crías durante cada estadio aunque en ocasiones excepcionales pueden incrementarse hasta 50. El mayor número de crías por *M. macrocopa* ocurre entre el quinto estadio, después del cual disminuye. (25)

## 2.2 IMPORTANCIA DE LA *M. macrocopa* EN PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.

*M. macrocopa* por poseer características muy similar ha *D. Magna*, organismo ampliamente utilizado en estudios toxicológicos (en el extranjero), es considerada como una especie útil en los estudios de evaluación de la calidad del agua y como representante general de los organismos zooplanctónicos de agua dulce por lo siguiente:

a) sensibilidad a tóxicos ambientales: se ha comprobado que *M. macrocopa* es sensible a sustancias tóxicas como son metales pesados como el dicromato de potasio, cobre, cromo, cadmio y plomo, etc. Es además, sensible a insecticidas, al etanol y fenoles. (25, 14)

b) Ciclo de vida corto: el ciclo de vida de la *M. macrocopa*, desde la entrada del huevo a la cámara de cría, hasta la muerte como adulto, es muy variable y depende de las condiciones ambientales (Pennak 1978), pero en general, su ciclo de vida es de 40 días a 25 °C y alrededor de 56 a 20°C. (25)

c) Son partenogénéticos: Cuando las condiciones son favorables, *M. macrocopa* se reproduce partenogénicamente. Este tipo de reproducción, las hembras solo producen huevos que dan origen a hembras presentando éstas, las mismas características genotípicas de las progenitoras, particularidad que les confiere una gran importancia para los estudios de toxicidad ya que, presentan las misma

características y que se puede asegurar que la sensibilidad ante la presencia de sustancias tóxicas, va a ser la misma que la de las madres. Por otro lado, el hecho de que los cultivos estén constituidos solamente por hembras, favorece la constante producción de juveniles útiles en las pruebas de toxicidad. (25)

d) Su fácil manejo: la *M. macrocopa* alcanza una talla máxima de 6 mm por lo cual, un gran número de ellas se puede cultivar en un espacio relativamente pequeño. Los juveniles, cuya talla es de 0.8 a 1 mm. de longitud, pueden ser observados sin ayuda de un microscopio óptico. Además por su pequeño tamaño pueden ser mantenidos en recipientes con poca cantidad de agua. (25)

e) Otras características que permiten su utilización son: Presentan un mayor control de enfermedades (por ejemplo el ataque de bacterias); su transportación no es complicada; son fáciles de alimentar; el costo de las pruebas es significativamente menor que la de los peces. (25)

### 2.3.- ACETILCOLINESTERASA.

El sistema nervioso autónomo (SNA) actúa por medio de la transmisión de impulsos nerviosos, los cuales avanzan a través de los nervios hasta llegar a las terminaciones nerviosas, provocando una respuesta característica en las células efectoras, como son secreción glandular, contracción o relajación muscular. La transmisión de este impulso de las citadas terminaciones a las células efectoras se realiza por intermedio de sustancias denominadas "transmisores químicos o neurotransmisores". (29)

El sistema nervioso autónomo actúa a nivel de sinapsis o uniones neuroefectoras, acciones excitatorias o inhibitorias, que se realizan de acuerdo a lo siguiente:

Cuando el impulso nervioso alcanza la terminación nerviosa, las vesículas sinápticas liberan sincrónicamente varios centenares de cuantos de neurotransmisor (acetilcolina o noradrenalina). Una vez liberado el neurotransmisor atraviesa por difusión la hendidura sináptica y se une con receptores específicos de la membrana postsináptica. Esta combinación puede dar lugar a dos tipos de procesos: a) aumento de la permeabilidad de la membrana por el ion sodio que genera un potencial postsináptico excitador. b) aumento de la permeabilidad por el ion potasio que da origen a un potencial inhibitorio por hiperpolarización de la citada membrana. (29)



Quando el potencial postsináptico alcanza su nivel crítico, da origen a un potencial de acción propagado en la célula efectora, lo que conduce a una estimulación de esta. Una vez producida su acción el neurotransmisor es eliminado por la sinápsis, por destrucción metabólica (acetilcolina) debida a enzimas contenidas en la membrana sináptica, o bien por recaptación (noradrenalina) de las terminaciones nerviosas, con lo que termina su acción. (29)

Para los crustáceos se tienen plenamente identificadas tres sustancias neurotransmisoras, las cuales son: acetilcolina (ACH), ácido  $\gamma$ -aminobutílico (GABA) y el ácido glutámico. Se sabe que estos neurotransmisores se encuentran en altas concentraciones en neuronas presinápticas, aunado con enzimas que regulan y trabajan junto con ellas. (1)

La ACH en mamíferos se encuentran en fibras nerviosas de las extremidades, en el músculo estomacal, en las glándulas sudorípidas, y algunas terminales nerviosas del sistema nervioso central. En crustáceos se sospecha que la ACH es un transmisor central, que puede ser extraído de ganglios y nervios. (1)

Una de las enzimas que actúan en el proceso de transmisión nerviosa es la acetilcolinesterasa (ACHasa), la cual está presente en diferentes organismos acuáticos, su función es la de restaurar la excitabilidad de la membrana postsináptica, mediante la destrucción metabólica de la ACH la cual es hidrolizada a acetato y colina, quedando así repolarizada la membrana y restaurando su permeabilidad. (1, 29)

La acetilcolinesterasa esta localizada en la hendidura sináptica, en donde se enlaza a una red de colágeno y glicosaminoglicanos derivados de la célula postsináptica. Esta enzima de 262 KD, tiene una estructura  $\alpha 2 \beta 2$ . Una característica llamativa de la acetilcolinesterasa es su elevado número de recambio, de  $25,000 \text{ s}^{-1}$ , lo que significa que hidroliza una molécula de acetilcolina en  $40 \mu\text{s}$ . El alto poder de recambio de la enzima resulta esencial para la restauración de rápida del estado polarizado de la membrana postsináptica. La sinapsis puede transmitir ceca de 1000 impulsos por segundo solamente si las membranas recuperan su polarización en una fracción de milisegundo. (11)

## 2.4.- P E T R O L E O

El petróleo es originado por la descomposición y transformación de muchas plantas y animales enterrados bajo sucesivas capas de lodo alrededor de 15 - 500 millones de años. El petróleo es una mezcla compleja de compuestos orgánicos de origen natural, que pueden existir en los tres estados físico: sólido, líquido y gaseoso, conforme a las condiciones de presión y temperatura. (36)

El petróleo crudo, está principalmente constituido por hidrocarburos y, en menor proporción, por compuestos inorgánicos y orgánicos. Los hidrocarburos son cadenas de átomos de hidrógeno y carbono, pueden ser clasificados de manera sencilla en saturados (parafinas y naftenos), insaturados (olefinas y acetilenos) y aromáticos (bencenos). Por otro lado entre los principales compuestos orgánicos se encuentran los asfaltenos y resinas; de los inorgánicos compuestos de azufre, nitrógeno, organometalicos, oxigenados entre otros. (24, 36)

El petróleo crudo está exclusivamente en productos naturales, muchos de los cuales son producidos por pozos artificiales. Este se presenta en muchas partes del mundo, y no solamente en tierra, sino que también en mares y océanos. (54)

Dada la complejidad con la cual está compuesto el petróleo, este tiende a ser refinado por métodos petroquímicos para la obtención de compuestos más sencillos, los cuales tienen gran utilidad para el hombre. Entre los

principales usos que se le han dado a los derivados del petróleo son: 1) compuestos iniciales o intermediarios para la síntesis de plásticos, pinturas, pesticidas, capas protectivas, resinas, tintes, fármacos, perfumes, vitaminas y explosivos entre otros; 2) Solventes para pinturas, tintes, resinas, lacas, hules, plásticos y pesticidas; 3) la de ser una fuente de combustible como las gasolinas, diesel, gas natural, lubricantes, aceites etc. (24)

Las industrias petroleras producen efluentes de desechos de variada composición. Todos estos efluentes, sin embargo, contienen derivados del petróleo los cuales pueden contaminar el agua y envenenar los organismos acuáticos. Los efluentes de desechos son producidos por la refinación ordinaria del petróleo, consisten del petróleo crudo, así como gran variedad de su refinados, los cuales incluyen ácidos, álcalis, fenoles, sulfitos entre otros. (54)

Frecuentemente, la contaminación por petróleo a nivel acuático se origina por las descargas en barcos y aviones por descuidos o accidentes en su transportación, y en el desarrollo de operaciones de perforación. Por otro lado la contaminación por petróleo es debida a derrames accidentales en mares y lagos, los cuales representan la pérdida de la vida silvestre, peces y vegetación. La contaminación de los océanos por petróleo es realmente extensa y esta se incrementa en magnitud y severidad con el excesivo aumento del uso del petróleo y sus derivados. (54)

#### 2.4.1. Toxicocinética.

La mayor ruta de absorción del petróleo y sus derivados en los organismos acuáticos es a través de su exposición a estos, por branquias, tracto gastrointestinal y por piel. Posteriormente estos tienden a bioacumularse en su organismo, la bioacumulación ocurre de manera rápida, aun cuando estos compuestos se encuentren a bajas concentraciones. (26, 27)

Los compuestos derivados del petróleo tienden a distribuirse de manera general en el organismo, encontrándose las mayores concentraciones en hígado y gonadas, el resto es distribuido en riñón, músculo, cerebro, tejido adiposo y circulación general. (26, 27)

La biotransformación de los compuestos del petróleo ocurre en hígado en donde ocurren una serie de reacciones enzimáticas y metabólicas para detoxificar dichos compuestos. Entre las principales enzimas que actúan se encuentran: la NADPH-dependiente y la llamada arilhidrocarbono hidroxilasa (AHH), enzima que utiliza la función mixta oxidasa (FMO). Por otro lado, los hidrocarburos pueden sufrir reacciones de oxidación a través de la enzima trans-dihidrolasa en la cual a los compuestos del petróleo se produce la transformación a fenol, catecolaminas y glutatión conjugado. (47)

La mayor parte de la excreción del petróleo y sus metabolitos en los peces ocurre vía branquias y en menor proporción son excretados por intestino y riñón (heces y orina). (27, 47)

#### 2.4.2. Efectos.

Los efectos en los organismos acuáticos producidos por petróleo varían de acuerdo a los diferentes composiciones químicas que presenta. Entre los efectos se encuentran la pérdida de la sensibilidad, hipoactividad, depresión del SNC, necrosis, incremento de la síntesis de proteínas y lípidos, disminución en el crecimiento y reproducción, disminución del sistema cardiovascular, depresión respiratoria, anoxia, pueden ser teratogénicos y producir cáncer. (18, 27)

#### 2.4.3. Mecanismos de toxicidad.

Las diversas formas que tiene el petróleo de actuar en organismos acuáticos dependen del tiempo de exposición, así como del tipo de compuestos derivados del este que se encuentren presentes (hidrocarburos, asfaltenos, resinas etc). (55)

Se propone que cuando el petróleo es derramado directamente sobre mares y océanos la muerte puede ser causada por la falla respiratoria, esto debido a que se genera un mecanismo que aumenta en el metabolismo, con ello incrementa la producción de ATP y a su vez el requerimiento de más oxígeno, dicho oxígeno es muy difícil de captar bajo esas condiciones. (54)

Por otro lado las fracciones solubles en agua (FSA) del petróleo actúan a nivel metabólico en donde se tiende a

inhibir diversos mecanismos como son: la síntesis de lípidos, hormonas, esteroides, vitaminas, proteínas, neurotransmisores y células sanguíneas entre otros. Además de causar lesiones a nivel cromosómico y en la síntesis de ADN. (55)

## 2.5.- P L O M O

En forma natural, el plomo se encuentra generalmente depositado en yacimientos metalíferos, como sulfuro (galena), carbonato (cerusita) o en combinación argentífera. El plomo también se encuentra en minerales de uranio, como un producto de deshecho radioactivo. (45)

El plomo y sus derivados son ampliamente utilizados en diversas industrias tales como las de pigmentos y tintes, textiles, acumuladores, vidrio de cerámica, tubos y canales, techos prefabricados, hojalatería, plásticos y hules, aleaciones, balas y proyectiles, cementos. Así mismo se utiliza y/o genera en procesos de: soldadura, producción de ácido sulfúrico, protección contra radiaciones, incineración de basura, utilización de cienos y lodo de alcantarillado. Además de ser usado para elevar el octanaje de las gasolinas. (45)

Las industrias que usan el plomo frecuentemente tienden a tirar sus desechos a los desagües de manera inconsiente, dando como resultado tarde o temprano la contaminación de ríos y mares, siendo esta una de las principales causas de contaminación por plomo de los mantos acuíferos. Otras causas de contaminación puede ocurrir de manera natural por medio del viento, escurrimientos de las lluvias, la sedimentación atmosférica y por las corrientes de agua superficiales y subterráneas lo acarrearán del suelo. (67, 54)



### 2.5.1. Toxicocinética.

La mayor ruta de absorción del plomo es a través del tracto gastrointestinal y branquias debido principalmente a que los organismos acuáticos están continuamente expuestos a él. Aún se conoce poco acerca de la transportación del plomo a través de la mucosa gástrica; se especula que este compete con el calcio en un mecanismo común de transporte. (8, 18, 45)

Después de la absorción el Pb es distribuido inicialmente en tejido blando, particularmente en el intestino, hígado y riñón. Posteriormente este es redistribuido y depositado en hueso, alrededor del 90 % del plomo es depositado en la matriz mineral del esqueleto. Aunque aun no se ha esclarecido la distribución del plomo en organismos invertebrados, se propone que la mayor cantidad es depositada en el músculo y en embriones en los cascarones de los huevos. Solo pequeñas cantidades de Pb inorgánico es acumulado en cerebro. Cuando el Pb está presente en altas concentraciones este puede encontrarse remanente en sangre. (8, 18, 45)

Entre los compuestos del plomo que pueden encontrarse en el medio acuático están entre los orgánicos el tetraetil y el tetrametil plomo y los inorgánicos principalmente sales de plomo como son: los nitratos, cloruros, sulfatos etc.; son los principales compuestos estables que se encuentran en el medio ambiente marino, siendo estos fácilmente absorbidos por organismos acuáticos. Estos compuestos son biotransformados en hígado en donde pueden sufrir biometilación principalmente para compuestos orgánicos.

mediante una serie de reacciones de metilación denominadas mecanismo B<sub>12</sub>, estas reacciones se realiza bajo condiciones anaerobias por la metiltransferasa, además de reacciones de alquilación dando origen a compuestos orgánicos de Pb. Mientras que los complejos inorgánicos de plomo sufren ataques electrofilicos por medio de la metil-B<sub>12</sub> ocurriendo el desplazamiento de los grupo metilo dando como resultado la formación de especies monometil-Pb, las cuales son muy inestables volviendose a formar las sales inorgánicas. (57)

La mayor parte de plomo es excretado por orina, en algunos casos por secreción gastrointestinal (heces). El tiempo de vida media del plomo en sangre y diversos tejidos es de aproximadamente de 1 a 2 meses, en hueso llega a tener un tiempo de vida media hasta de 30 años. (18)

#### 2.5.2. Efectos.

En relación de los efectos biológicos producidos por este metal, es importante señalar que afecta a numerosos órganos y sistemas. (18)

Entre los sistemas que son más dañados, se encuentra el sistema nervioso central (SNC) y el periférico (SNP). Por otro lado, se produce anemia y neurosis. Y por su acción específica sobre SNP, debilidad en los músculos extensores y pérdida de la sensibilidad. Ocasionalmente el plomo produce encefalopatía, caracterizada por vómito, apatía, somnolencia, hiperactividad, y otros signos y síntomas neurológicos. (18, 45)

La anemia es uno de los primeros síntomas de la intoxicación por este metal. Dicho efecto es el resultado tanto de los complejos desórdenes que provoca el toxón en la biosíntesis del grupo hemo, como de su influencia del eritrocitos circulantes. (18, 45)

En algunos estudios se ha encontrado hepatocidad y nefrotoxicidad. El plomo causa disfunción tubular, con cambios de ultraestructura en las mitocondrias, lo cual da como resultado aminoaciduria, glicosuria y fosfaturia. Recientes estudios han demostrado que el plomo causa interferencia en la excreción de ácido úrico provocando efectos reumáticos. (18, 45)

El plomo está asociado con la depresión de muchas funciones endocrinas, particularmente la tiroide y adrenal. El plomo además suprime la función testicular, produciendo esterilidad en machos que han sido expuesto en forma prolongada. No existen evidencias de que el plomo sea teratogénico, ni carcinogénico, sin embargo, en algunos animales se ha encontrado que es carcinogénico en dosis altas, siendo el hígado el más afectado. (18, 45)

### 2.5.3. Mecanismos de toxicidad.

Entre los diversos efectos que tienen el plomo sobre los organismos se encuentran asociados a varios mecanismos de acción que son:

los efectos sobre SNC son debidas a la inhibición de las funciones colinérgicas, posiblemente por la disminución de calcio extracelular. Otro de los cambios de las funciones

neurotransmisores incluyen el daño de dopamina en circulación, así como la inhibición de la enzima ácido  $\gamma$ -aminobutilico (GABA). Estudios más recientes, Markovac y Goldstein (1988) encontraron que puede el calcio ser remplazado en la activación de proteínas kinasas fosfolipido-dependiente (proteína Kinasa C) en venas del cerebro. (18)

Dentro de los efectos hematológicos son provocados como resultado de la inhibición de la enzima piridina-5-nucleotidasa (Py-5-N). Existe una relación inversamente proporcional entre la inhibición de la Py-5-N y la concentración de plomo en sangre. La anemia producida por envenenamiento de Pb es debida a dos defectos básicos: disminución de la vida media de los eritrocitos y el daño en la síntesis del grupo Hemo. Lo segundo provocado por la disminución de la enzima ácido  $\delta$ -amino levulinico dehidratasa. El Pb además disminuye la actividad de la ferroquelatasa. (18)

## 2.6.- INSECTICIDAS.

La necesidad de contar con grandes cantidades de alimentos, para satisfacer las necesidades de una población creciente, requiere de una producción masiva de los mismos, que es imposible llegar sin nuevas técnicas de cultivo, semilla mejorada, sistemas de irrigación adecuados, maquinaria agrícola moderna, y el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos. (2, 21)

Entre el desarrollo de las técnicas de mejoramiento del cultivo se encuentran los plaguicidas, que son compuestos químicos diseñados para destruir directamente especies no económicas para el hombre como son insectos, ácaros, moluscos, roedores, hongos, malas hierbas, bacterias y otras formas de vida animal o vegetal perjudiciales a la salud pública, a la agricultura, al sector, pecuario, a sus productos y otras materias primas alimenticias. Los beneficios originados por su uso han sido enormes: al reducir o eliminar vectores de enfermedades; al destruir o controlar plagas agrícolas y a los que afectan a los alimentos almacenados o dañan satisfactores del hombre (edificios, textiles etc.). Sin devaluar sus beneficios y pese a su creciente utilidad, un plaguicida de cualquier clase se convierte en contaminante cuando afecta a algún organismo para el cual no fue diseñado. (2, 21)

Los plaguicidas llegan a los cuerpos acuáticos principalmente por escurrimientos de las tierras sometidas a

las prácticas agrícolas aprobadas y de salud pública, pero también por derrames o por descargas deliberadas (desagües deliberados y residuos de fumigaciones urbanas o industriales). Otra causa de contaminación acuática por plaguicidas es la utilización directa de los mismos para prevenir enfermedades como son: malaria, esquistomosis etc. o para controlar plagas como el lirio acuático, lamprea marina etc. (34, 54)

#### 2.6.1 Piretros.

El piretro es un insecticida de contacto obtenido de las cabezas florales de *Crysanthemum cinerariaefolium* y se ha usado como insecticida desde la antigüedad. La producción del piretro data aproximadamente desde 1850 y su uso a crecido en la actualidad, a pesar del aumento del uso de insecticidas sintéticos. El piretro se obtiene de las hojas secas del crisantemo, y el extracto se concentra por destilación por vacío. Contiene cuatro componentes principales llamados piretrinas. Estos son ésteres de dos ciclopentenolonas y dos ácidos propanocarboxílicos. Los alcoholes se conocen como piretrilona y cinerolona, mientras que los ácidos carboxílicos son los ácidos crisantémicos y pirétrico. (12)

Uno de los insecticidas piretroides empleados en México es el "Solfac" cuyo principio activo es el cifutril, es ampliamente utilizado en México para prevenir plagas y enfermedades acuáticas, es altamente soluble en agua de ahí su gran utilización en la agricultura y uso doméstico.

### 2.6.2. Toxicocinética.

El piretro puede absorberse por el tubo digestivo y por branquias, la absorción por piel es despreciables aun cuando este se encuentre en continuo contacto esto debido a su alta polaridad. la distribución de los piretroides es de manera sistémica. Los ésteres que constituyen las mezclas de los piretros son rápidamente destoxificados por hidrolisis en en tubo digestivo y en menor grado en otros tejidos. La vía metabólica principal de los piretroides parece implicar la oxidación, por medio de la función mixta oxidasa (fMO), en donde uno de los grupos metilos de la cadena lineal del isobutenilo fijada al anillo del ciclopropano es oxidado a ácido carboxílico, mientras que el resto de la estructura permanece intacto. La mayor parte de los ácidos monocarboxílicos del crisantemo, que se forman son excretados por orina. (12)

### 2.6.3. Efectos.

Los piretroides afectan tanto a sistema nervioso central como al periférico, dando como resultado el bloqueo total de la transmisión nerviosa. Entre los principales síntomas se encuentran la pérdida de la sensibilidad, convulsiones, parálisis. A pequeñas concentraciones causa dermatitis leve, eritomatosa, vesicular y prurito intenso. Puede producir reacciones anafilácticas graves, incluyendo colapso vascular periférico y dificultad respiratoria. (12)

#### 2.6.4. Mecanismos de toxicidad.

La gran mayoría de los piretroides tienen gran competencia por un gran número de receptores del sistema nervioso central y periférico como son los receptores nicotínicos, receptores de acetilcolina, complejo GABA-Cl, canales de calcio y  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa. (12, 16)



## 2.7.- DETERGENTES.

El constante crecimiento de las poblaciones y sus demandas, traen consigo el diseño de la tecnología y el desarrollo de la industria a la producción de compuestos sintéticos para uso tanto doméstico, comercial e industrial. Dentro de los productos de uso doméstico que dentro de las dos últimas décadas ha presentado mayor incremento en su producción, se encuentran los detergentes sintéticos cuyo empleo ocasiona graves problemas de contaminación en el agua. (19, 48, 54)

Los detergentes sintéticos como ya se mencionó, contaminantes comunes del agua, ya que tienen un elevado consumo doméstico e industrial, debido a su propiedad de separar partículas de suciedad adheridas, conservandolas en disolución o suspensión. Estos productos han sustituido a los detergentes naturales y en la actualidad acaparan el 80 % del mercado mundial. (28, 48, 54)

Los detergentes sintéticos son compuestos químicos sintetizados a partir de productos de destilación del petróleo los más importantes son: los alquil bencen-sulfonato lineal (LAS) y el alquil bencen-sulfonato ramificado, este último es el más frecuentemente utilizados en nuestro país. Su síntesis se realiza a partir de un hidrocarburo aromático, generalmente benceno. Los agentes tensoactivos son la base de los detergentes (10 - 40 %). Además de los agentes tensoactivos los detergentes tienen

componentes que incrementan el poder limpiador entre los que tenemos: los fosfatos y de agentes auxiliares. Dentro de estos componentes los fosfatos, se encuentran en una proporción alta que va desde el 10 al 40 % del producto. esta concentración se puede explicar en base al efecto sinérgico que tienen estos para ayudar a la acción de los demás elementos, ya que actúan como suavizadores de agua, debido a su capacidad de "secuestrar" (forma complejos de coordinación) a iones  $\text{Ca}^{2+}$  y otros cationes que imparten dureza al agua. Los fosfatos también mantienen el valor de pH a niveles de alcalinidad, de tal manera que los grupos sulfonato no son protonados, y con lo cual permite que estos puedan apresurar la liberación de partículas (suciedad) de los objetos que se estén lavando. (19, 28, 48)

Los agentes tensoactivos son generalmente derivados del petróleo, por lo que tienen una fracción lipofílica y un extremo o grupo fuertemente hidrofílico. Esta estructura le permite distribuirse entre una fase hidrofóbica y una hidrofílica, abatiendo la tensión superficial. Considerando su comportamiento electrolítico en el agua, los agentes tensoactivos se clasifican en: aniónicos, catiónicos, anfotéricos y no iónicos. Los más utilizados comercialmente son los aniónicos especialmente los alquilbencensulfonatos. (19, 28, 48).

Entre los alquilbencensulfonatos encontramos al laurilsulfato de sodio y al dodecilsulfato de sodio, los cuales son ampliamente utilizados en nuestro país en la mayoría de los detergentes sintéticos.

### 2.7.1. Toxicocinética.

La absorción de detergentes en organismos acuáticos ocurre a través de las branquias y piel. Son ampliamente distribuidos en el organismos encontrándose las mayores concentraciones en branquias, vesícula biliar, TGI, hígado, riñón y bazo, y en menor proporción en cerebro y músculo. (22)

### 2.7.2. Efectos.

Dado que las principales vías de absorción en organismos acuáticos son branquias y piel, estas tienden a ser mayormente afectadas por los detergentes, presentándose cambios morfológicos, los cuales afectan los procesos primarios de las branquias: respiración y excreción de sustancias de deshecho, así como la osmoregulación, y predisposición al ataque de microorganismos patógenos. Del mismo modo presentan cambios en las papilas gustativas y severos cambios histológicos a nivel de branquias, con lo cual con lleva la pérdida del olfato. A nivel de piel también se observan cambios histológicos sobre células epiteliales. Otras investigaciones indican que peces expuestos a detergentes tienden a decrecer la tolerancia de oxígeno disuelto a concentraciones bajas. (35, 58)

Por otra parte, existen reportes de efectos en branquias, sobre la actividad de enzimas respiratorias y de la fosfatasa ácida en exposiciones de tipo agudo. Así mismo reportan cambios en la actividad de ATPasa de diversos órganos, en un estudio subcrónico. (32)

### 3.- OBJETIVOS.

#### GENERALES.

- Evaluar el efecto producido por el Petróleo, plomo, solfac, duodecibencensulfonato de sodio y Lauril sulfato de Sodio, sobre la actividad de la acetilcolinesterasa de Moina macrocopa, utilizandola como parámetro bioindicador de la calidad del agua.

#### PARTICULARES.

- Evaluar la actividad de acetilcolinesterasa de la Moina macrocopa por unidad de proteína bajo condiciones normales.

- Evaluar la actividad de acetilcolinesterasa de la Moina macrocopa por unidad de proteína después de ser expuesta con los diversos xenobioticos a diferentes concentraciones.

- Evaluar el contenido de proteínas de sobrenadante de homogenizado de M. macrocopa por ml.

#### 4. - MATERIAL Y METODOS.

##### 4.1 Cultivo de la *Moina macrocopa*.

La *Moina macrocopa* fue obtenida del lago de texcoco, y esta fue cultivada en el laboratorio de toxicología acuática en las siguientes condiciones:

fue colocada en un recipiente con una area de 20 cm<sup>2</sup> aproximadamente, en un medio de agua sintética, la cual fue preparada de la siguiente manera: (19)

a) Se colocaron 19 litros de agua desionizada en un recipiente de plástico perfectamente limpio. Agregando 2.4 g de MgSO<sub>4</sub>, 3.48 g. de NaHCO<sub>3</sub> y 0.16 g. de KCl al recipiente en el orden respectivo, se aereó toda la noche mediante una bomba de aire.

b) Posteriormente se agregaron 2.4 g de CaSO<sub>4</sub> . 2 H<sub>2</sub>O a 1000 ml de agua desionizada en un matraz elenmeyer de 1000 ml. Se colocó la solución con un agitador magnético hasta que el sulfato de calcio estuviese totalmente disuelto. Posteriormente se adicionó a los 19 litros preparados con anterioridad y se mezcló perfectamente. Por último se aereó dos horas antes de ser utilizada

las características que se obtuvieron del agua sintética fueron de: pH = 7.2 - 7.8; con una dureza de 40 - 48 mg CaCO<sub>3</sub>/lt. y una alcalinidad de 30 a 35 mg CaCO<sub>3</sub>/lt. Dichas evaluaciones se realizaron al final de la preparación del agua sintética. Se realizaba un recambio de agua cada semana.

Los organismos ya en los recipiente correspondientes fuerón colocados en un lugar con luz tenue, a una temperatura que se mantuvo a  $20 \pm 2$  °C

Los organismos fueron alimentados cada tercer día con una dieta basada en una suspensión de alga *Ankistrodermus falcatus* en una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml.

#### 4.2. Exposición de *M. macrocopa* a los Xenobioticos.

Para la exposición de los organismos a los xenobióticos se realizó de la siguiente manera:

A un lote de *M. macrocopa* de aproximadamente 10.0 g de peso húmedo fueron homogeneizados con 200.0 ml de tris buffer pH = 7.0 en un vortes. posteriormente el homogenizado fue centrifugado en una centrifuga refrigerada a - 5 °C, a 14,000 rpm durante 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron 4 alicuotas de 2.0 ml a las cuales se les adicionó 1 ml de la solución problema (toxón) y 1 ml de cloruro de ACH en concentraciones de 8.0, 10.0, 12.0 y 14.0  $\mu\text{mol/ml}$  respectivamente. Por otro lado, se tomaron 4 alicuotas de 2 ml del mismo sobrenadante y se adicionó 1 ml de tris buffer pH = 7.0 y 1 ml de cloruro de ACH con la mismas concentraciones utilizadas con los toxones, este último se considero como lote control. Posteriormente todos los tubos fueron incubados en baño maria a 25 °C durante 30 minutos.

Las concentraciones de los toxones fueron:

Plomo, solfac y petróleo: 0.1, 1.0, 10.0 y 100 ppm.

Lauril sulfato Na. y DBSS: 0.25, 2.5, 25.0 y 250 ppm.

## Preparacion de Soluciones:

### Plomo.

El plomo se preparó a partir de una solución stock de nitrato de plomo (R.A.) con una concentración de 400 ppm. del cual posteriormente se realizaron diluciones, hasta obtener las concentraciones correspondientes.

### Solfac:

El solfac se preparó a partir de una muestra comercial la cual contenía el 10 % del activo (CIFUTRIL), Este fue disuelto en agua desionizada, posteriormente la solución fue filtrada y a partir del filtrado se preparó una solución stock con una concentración de 400 ppm. del cual después se obtuvieron las concentraciones anteriormente mencionadas.

### Petróleo.

La solución de petróleo fue preparado a partir de una muestra de petróleo crudo, del cual se tomaron 10 ml, se mezclaron con 100 ml de agua sintética y se mantuvo en agitación durante 1 hr. en baño de hielo. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 14 000 rpm durante 30 minutos. De la fase acuosa se preparó una solución stock de 400 ppm, partiendo que la densidad de la fracción acuosa era de 1 g/ml. A partir de ella se prepararon las diluciones mencionadas.

Por otro lado a la fracción acuosa se le realizó un barrido en un espectro infrarojo para determinar la presencia de compuestos derivados del petróleo.

### Lauril sulfato Na. y Duodecil bencensulfonato Na.

Estos se prepararon para cada una a partir de un R.A. del cual se realizó una solución stock de 1000 ppm. de la cual se obtuvieron las concentraciones correspondientes.

\*\*\* Las concentraciones iniciales de cada uno de los toxones eran más concentradas para que durante la exposición de la enzima al xenobiótico esta fuera las correspondientes a las establecidas.

#### 4.3. Evaluación de la actividad de la acetilcolinesterasa.

La actividad de la acetilcolinesterasa fue determinada por un método indirecto mediante la evaluación de su sustrato (acetilcolina), la cual se llevo a cabo por el método de Hestrin (1949).

La determinación de la acetilcolina fue como sigue: a 1 ml de la solución de ACH se adicionó 3 ml de tris buffer pH = 7.0, posteriormente se hizo reaccionar con 2 ml de hidroxilamina alcalina 2 M, 1 ml de HCl 4 N. y 1 ml de FeCl<sub>3</sub> 0.34 M. Por último fue leído en un espectrofotómetro Variam DMS a 540 nm.

Se realizó una curva de calibración del sustrato con cantidades crecientes de acetilcolina. Dicha curva de calibración se realizó de dos maneras: La primera fue adicionando 1 ml de ACH con concentraciones de 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 y 15.0  $\mu\text{mol/ml}$  respectivamente, al cuales se les adicionó 3 ml de buffer tris pH 7.0, se incubo durante 30 minutos a 25 °C. posteriormente se continuo la reacción anteriormente descrita. Después se leyo a 540 nm. La segunda forma fue la evaluación de la acetilcolina utilizando el cladópero (*M. macrocopa*), el cual previamente se habia inactivado la enzima. Dicha inactivación se realizó tomando 2 g de pulga peso húmedo y homogeneizarlos con 10 ml de HCl 4 N, posteriormente esta fue neutralizada con 9.5 ml de NaOH 4 N. De dicho homogenizado fue centrifugado a 14 000 rpm durante 15 minutos y de este se tomaron alicuotas de 2 ml, se les adicionó 1 ml de ACH de cada una de las



concentraciones utilizadas más 1 ml de buffer tris pH 7.0; se incubó a 25 °C durante 30 minutos, posteriormente se siguió con la reacción. Después se leyó a 540 nm.

Para el caso de las determinaciones de las soluciones problema se realizó la reacción de igual manera al de la curva estándar, pero en lugar de usar buffer tris se utilizó las soluciones incubadas.

#### 4.4. Determinación de proteínas.

Conjunto a la determinación de acetilcolinesterasa se determinó el contenido de proteínas por lote de la *M. macrocopa*.

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976), en el cual se hace reaccionar las proteínas con reactivo de Bradford durante 5 minutos, posteriormente se lee a 595 nm en un espectrofotómetro. El reactivo de Bradford fue preparado a partir de mezclar azul de coomassin, etanol y ácido fosfórico en proporciones de 0.01% (m/v), 4.7% (m/v) y 8.7% (m/v) respectivamente.

Se realizó una curva de calibración utilizando albumina de bovino en la cual se colocaron 100  $\mu$ l de albumina que contenían 15, 30, 45, 60 y 75  $\mu$ g/ml respectivamente y fueron adicionados 2.5 ml de reactivo de Bradford, posteriormente se dejó transcurrir 5 minutos y se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro Varian DMS 90.

A partir del sobrenadante utilizado en la determinación de la actividad de acetilcolinesterasa se tomó 100  $\mu$ l de este, y se hizo reaccionar con reactivo de Bradford, se dejó 5 minutos que reaccionaran y fueron leídos a 595 nm. en un espectrofotómetro Varian DMS 90.

A todos los resultados se les practico un analisis estadístico de ANOVA junto a una prueba de Duncan (comparación de medias).

## 5.- R E S U L T A D O S

La determinación de la actividad de la ACHasa expresada en  $\mu\text{mol}$  de ACH hidrolizados/mg de proteína/min de *M. macrocopa* fue determinada mediante la diferencia entre la cantidad inicial adicionada de cloruro de ACH y la determinada después de la exposición

La actividad de ACHasa de *Moina macrocopa* expuesta a diferentes concentraciones de la fracción acuosa de petróleo (FAP) se muestran en la tabla I y figura 1, se observó que los homogeneizados de *Moina macrocopa* que fueron incubados a 8  $\mu\text{mol}$  y tratados con las concentraciones de FAP no mostraron diferencia significativa con respecto al control. A 10 y 14  $\mu\text{moles}$  se presentó una disminución de la actividad enzimática, mientras que a concentraciones de 12  $\text{mcmol}$  ACH mostró una estimulación de la actividad de la ACHasa.

Sin embargo, en 10  $\mu\text{moles}$  de ACH hubo una inhibición de  $14 \pm 2 \%$  de la actividad a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10.0 ppm de la FAP, pero a 100 ppm de este xenobiotico se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Mientras que a 14  $\mu\text{mol}$  de ACH la inhibición fue de  $17 \pm 2 \%$  a excepción de la de 1.0 ppm. También se obtuvo la estimulación de la actividad enzimática a 12  $\mu\text{moles}$  de ACH de  $30 \pm 2 \%$  a 0.1, 10.0 y 100 ppm de FAP y de 41 % a 1.0 ppm.

En el efecto de plomo sobre la actividad de la ACHasa de *M. macrocopa* se muestran en la tabla II y figura 2, se

observó una inhibición de la actividad a todas las concentraciones utilizadas del metal, el comportamiento en general que mostró este tratamiento fue el de incrementar la actividad conforme aumento la cantidad de ACH. Cabe hacer mención que estos incrementos fuera menor que los lotes control.

La inhibición producida por este metal mostró que a 8  $\mu\text{mol}$  de ACH fue de  $13 \pm 2\%$  a 0.1, 1.0 ppm 20 % 10 ppm. Mientras que a 10, 12 y 14  $\mu\text{mol}$  de ACH la inhibición fue del  $18 \pm 2$ ,  $21 \pm 2$  y  $17 \pm 2$  respectivamente para 0.1 1.0 y 10.0 ppm de Pb, de las cuales no se presentó diferencia significativa entre ellas. En cuanto a 100 ppm se presentó una inhibición del  $93 \pm 3\%$  en todas las concentraciones de ACH.

La actividad de ACHasa de *M. macrocopa* se observa que presenta una disminución cuando está se expuso a diferentes concentraciones de solfac. Los resultados se presentan en la Tabla III y figura 3, en donde, se observó que durante las tres concentraciones iniciales de solfac (0.1, 1.0 y 10.0 ppm) no presentó diferencia significativa entre ellos pero si con respecto al control para cada una de las concentraciones de ACH. La inhibición producida fue de 5.74,  $14 \pm 1$ ,  $12 \pm 1$  y  $20 \pm 2\%$  a 8, 10, 12 y 14  $\mu\text{mol}$  respectivamente. Posteriormente esta inhibición de la actividad se incrementó a la concentración de 100 ppm teniendose una inhibición de 13.11, 22.86, 26.80 y 30.57 para las concentraciones correspondientes.

En el efecto producido por el DBSS sobre la actividad de la ACHasa en *M. macrocopa* (tabla IV y figura 4), se

observo una inhibición de la actividad cuando esta fue expuesta a diferentes concentraciones de DBSS a excepción de la utilizadas a 12  $\mu\text{mol}$  ACH en donde no se observó diferencia con el control a 0.25, 2.5 y 25.0 ppm de DBSS. Se observó que a concentraciones de 0.25, 2.5 y 25 ppm la inhibición producida es de  $15 \pm 5$ ,  $28 \pm 5$  y  $18 \pm 3$  % a 8, 10 y 14  $\mu\text{moles}$  respectivamente. La máxima inhibición se presentó a 250 ppm y que la disminución de la actividad fue de 74.2, 72.8, 43.1 y 90.03% para cada una de las concentraciones correspondientes de ACH.

Los efectos producidos por LAS sobre la actividad de la ACHasa en *M. macrocopa* se muestran en la tabla V. En este tratamiento se observó que a las concentraciones de 8 y 10  $\mu\text{moles/ml}$  de cloruro ACH no presentan ningún efecto sobre la ACHasa a excepción de la concentración más alta de LAS (250 ppm), a las concentraciones de 12 y 14  $\mu\text{moles}$  se observó una disminución de la actividad de ACHasa. en un  $18 \pm 3$  % a 0.25, 2.5 y 25.0 ppm.

Así mismo se observó que a 250 ppm de LAS presentó una inhibición del  $98 \pm 2$  % de la actividad de la ACHasa.

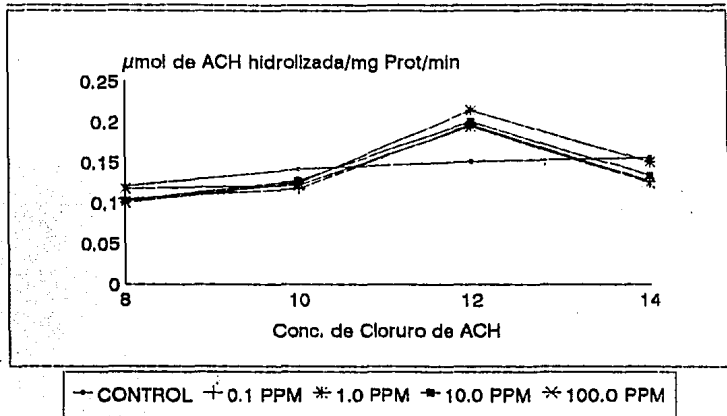
TABLA I

Efecto de la fracción acuosa de petróleo sobre la actividad de la Acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa*.

Actividad Enzimática de ACHasa en <i>M. macrocopa</i> ( $\mu\text{mol}$ de ACH hidrolizada/mg de prot/min)				
Concentración de FAP (ppm)	$\mu\text{mol}$ de cloruro de ACH.			
	8	10	12	14
CONTROL	0.121	0.142	0.152	0.156
0.1	0.105	0.118	0.197	0.197
1.0	0.101	0.125	0.215	0.151
10.0	0.103	0.128	0.201	0.134
100.0	0.118	0.122	0.195	0.125

\* Los resultados corresponden a las medias obtenidas de un ANOVA  $p < 0.05$

## EFFECTO DEL PETROLEO SOBRE LA ACHasa DE *M. macrocopa*



Cada valor corresponde a la media de 7 réplicas  $\pm$  D.S.

FIGURA 1. Efecto de la fracción acuosa de petróleo sobre la actividad de ACHasa de *M. macrocopa* expuesta a diferentes concentraciones durante 30 minutos.

TABLA II

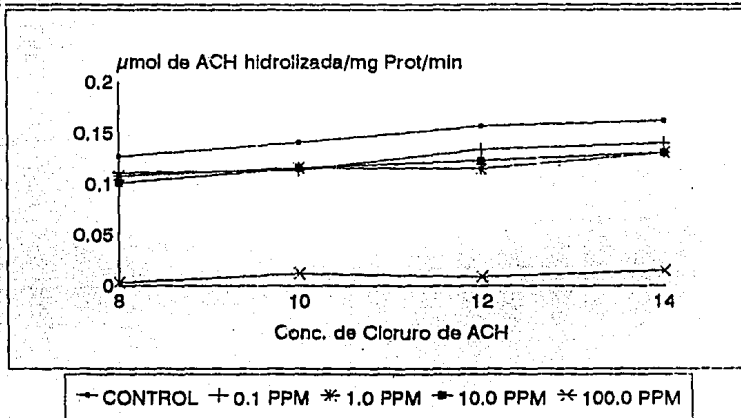
Efecto del plomo sobre la actividad de la Acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa*.

Actividad Enzimatica de ACHasa en <i>M. macrocopa</i> ( $\mu\text{mol}$ de ACH hidrolizada/mg de prot/min)				
Concentración de Pb (ppm)	$\mu\text{mol}$ de cloruro de ACH.			
	8	10	12	14
CONTROL	0.127	0.141	0.157	0.162
0.1	0.111	0.114	0.134	0.140
1.0	0.108	0.116	0.115	0.131
10.0	0.101	0.116	0.123	0.131
100.0	0.004	0.012	0.009	0.015

\* Los resultados corresponden a las medias obtenidas de un ANOVA  $p < 0.05$



## EFFECTO DEL PLOMO SOBRE LA ACHasa DE *M. macrocopa*



Cada valor corresponde a la media de 7 réplicas  $\pm$  D.S.

FIGURA 2. Efecto del plomo sobre la actividad de ACHasa de *M. macrocopa* expuesta a diferentes concentraciones durante 30 minutos.

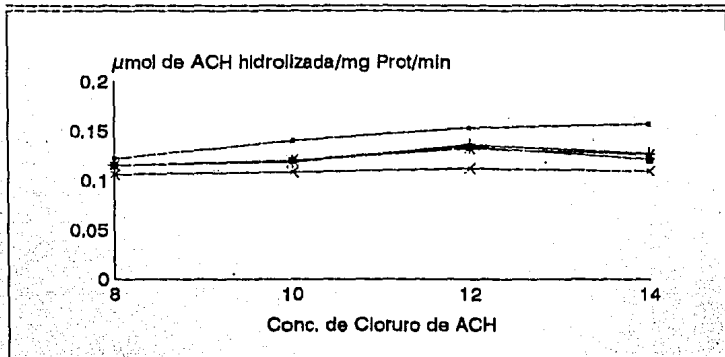
TABLA III

Efecto del solfac sobre la actividad de la Acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa*.

Actividad Enzimática de ACH en <i>M. macrocopa</i> ( $\mu\text{mol}$ de ACH hidrolizada/mg de prot/min)				
Concentración	$\mu\text{mol}$ de cloruro de ACH:			
Solfac (ppm)	8	10	12	14
CONTROL	0.122	0.141	0.153	0.157
0.1	0.115	0.118	0.136	0.127
1.0	0.115	0.120	0.132	0.126
10.0	0.115	0.120	0.134	0.121
100.0	0.106	0.108	0.112	0.109

\* Los resultados corresponden a las medias obtenidas de un ANOVA  $p < 0.05$

## EFFECTO DEL SOLFAC SOBRE LA ACHasa DE *M. macrocopa*



—○— CONTROL + 0.1 PPM \* 1.0 PPM ■ 10.0 PPM × 100.0 PPM

Cada valor corresponde a la media de 7 réplicas  $\pm$  D.S.

FIGURA 3. Efecto del solfac sobre sobre la actividad de ACHasa de *M. macrocopa* expuesta a diferentes concentraciones durante 30 minutos.

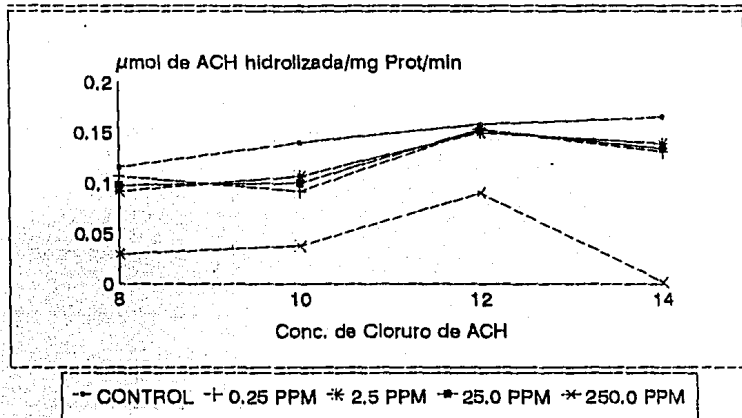
TABLA IV

Efecto del Duodecibencensulfonato de sodio sobre la actividad de la Acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa*.

Actividad Enzimática de ACHasa en <i>M. macrocopa</i> ( $\mu\text{mol}$ de ACH hidrolizada/mg de prot/min)				
Concentración DBSS (ppm)	$\mu\text{mol}$ de cloruro de ACH.			
	8	10	12	14
CONTROL	0.116	0.140	0.158	0.165
0.25	0.107	0.092	0.153	0.131
2.5	0.092	0.107	0.130	0.139
25.0	0.092	0.100	0.153	0.134
250.0	0.030	0.038	0.090	0.001

\* Los resultados corresponden a las medias obtenidas de un ANOVA  $p < 0.05$

## EFFECTO DEL DBSS SOBRE LA ACHasa DE *M. macrocopa*



Cada valor corresponde a la media de 7 réplicas  $\pm$  D.S.

FIGURA 4. Efecto del duodecibencensulfonato de sodio sobre la actividad de ACHasa de *M. macrocopa* expuesta a diferentes concentraciones durante 30 minutos.

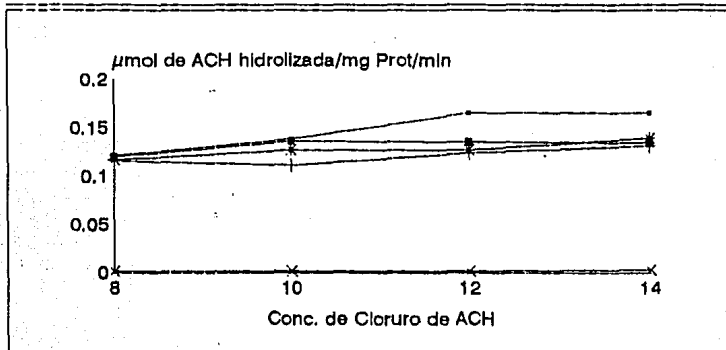
TABLA V

Efecto del laurilsulfato de sodio sobre la actividad de la Acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa*.

Actividad Enzimática de ACHasa en <i>M. macrocopa</i> ( $\mu\text{mol}$ de ACH hidrolizada/mg de prot/min)				
Concentración de LAS (ppm)	$\mu\text{mol}$ de cloruro de ACH.			
	8	10	12	14
CONTROL	0.121	0.138	0.165	0.165
0.25	0.116	0.111	0.124	0.131
2.5	0.117	0.127	0.127	0.139
25.0	0.120	0.136	0.135	0.134
250.0	0.001	0.001	0.001	0.002

\* Los resultados corresponden a las medias obtenidas de un ANOVA  $p < 0.05$

# EFECTO DEL LAS SOBRE LA ACHasa DE *M. macrocopa*



○ CONTROL + 0.25 PPM \* 2.5 PPM ■ 25.0 PPM × 250.0 PPM

Cada valor corresponde a la media de 7 réplicas  $\pm$  D.S.

FIGURA 5. Efecto del laurilsulfato de sodio sobre la actividad de ACHasa de *M. macrocopa* expuesta a diferentes concentraciones durante 30 minutos.

EFECTO DE LA INGESTION DE LA ACTIVIDAD DE LA ACHASA PRODUCIDA  
POR LOS DIVERSOS XENOBIOTICOS

FRACCION ACUOSA DE PETROLEO

CONC.	mcmol de ACH			
FAP	8	10	12	14
0.1	NS	14±2	30±2 *	17±2
1.0	NS	14±2	30±2 *	17±2
10.0	NS	14±2	41±2 *	17±2
100.0	NS	14±2	41±2 *	17±2

\* Corresponden a porcentajes de estimulación

P L O M O

CONC.	mcmol de ACH			
PLOMO	8	10	12	14
0.1	13±2	18±2	30±2	18±2
1.0	13±2	21±2	30±2	21±2
10.0	20±2	17±2	17±2	17±2
100.0	93±3	93±3	93±3	93±3

S O L F A C

CONC.	mcmol de ACH			
SOLFAC	8	10	12	14
0.1	5.7±1	14±1	12±2	20±2
1.0	12±1	14±1	12±2	20±2
10.0	20±1	14±1	12±2	20±2
100.0	13±2	22±2	26±2	30±2



## D . B . S S .

CONC.	mcmol de ACH			
D.B.SS.	8	10	12	14
0.25	15±5	28±5	NS	18±3
2.5	28±5	28±5	NS	18±3
25.0	28±5	28±5	NS	18±3
250.0	74±2	72±5	43±2	90±3

## L . A . S .

CONC.	mcmol de ACH			
L.A.S.	8	10	12	14
0.25	NS	NS	18±3	18±3
2.5	NS	NS	18±3	18±3
25.0	NS	NS	18±3	18±3
250.0	98±2	98±2	98±2	98±2

NS. - No presentan diferencia significativa con respecto al control

## 6. - D I S C U S I O N.

Es importante hacer mención que para seleccionar un parámetro bioquímico deben de tomarse en cuenta de manera general, es decir que no todos los agentes tóxicos actúan de manera similar, por lo que se debe de cuidarse este factor, para que dicho parámetro sea un verdadero indicador de los niveles de contaminación.

Uno de estos parámetros bioquímicos es la cuantificación de la enzima AChasa, cuya molécula es muy compleja y esta puede interactuar con su sustrato, de la manera siguiente : se encuentran involucrados cuatro grupos y dos sitios activos. La interacción del sitio aniónico es a través de un grupo fosfato de la enzima y el grupo trimetilamonio de la acetilcolina. La correspondiente al sitio esterarico en donde los núcleos del imidazol de la enzima con el grupo acetyl de la acetilcolina. La interacción de la acetilcolinesterasa y sus sustrato puede sufrir competencia con los toxones de manera reversible o irreversible. (11)

Existen diversas maneras sobre las cuales se puede interactuar la AChasa con los diferentes xenobióticos que pueden estimular o inhibir a esta enzima, ya que su estructura química interactúa a través de diferentes mecanismos, los cuales se pueden resumir en dos tipos, el primero es la reacción del xenobiótico con la apoenzima, y

un segundo a nivel de reacciones de enlazamiento o transformación con su sustrato normal (ACH). (11)

El primer grupo de reacciones incluyen: las reacciones químicas con lo grupos específicos de las proteínas que interactúan independientemente al sitio activo; reacciones específicas con los sitios de la apoenzima; desnaturalización de las proteínas de la ACHasa, hidrólisis de la apoenzima. (11)

El segundo grupo de reacciones son aquellas en la que el xenobiótico puede interaccionar con: un compuesto activador, con el complejo ACHasa-ACH, los componentes de enlace en un agregado enzimático. Además el xenobiótico puede actuar con la ACHasa y sufrir reacciones similares al sustrato. (11)

Cuando el petróleo es derramado sobre a ríos y mares tiende a combinarse con el agua, dada sus características fisicoquímicas de los compuestos que lo conforman estos pueden ser misibles en en el agua y es por ello que se debe de tomar en cuenta el factor solubilidad, ya que debido a este van ha estar presentes tóxicos más específicos. Entre los principales compuestos presentes en la fracción soluble en agua (FSA) se encuentran entre un 20 y 50 % corresponden a los hidrocarburos aromáticos monocíclicos (Whipple Jeannette A. et al, 1981) entre los que se incluyen al benceno, tolueno, etilbenceno y otros sustitutos del benceno, los cuales representan toxicidad y relativa solubilidad en agua. Sin embargo se ha demostrado que existen compuestos derivados del naftol como por ejemplo el dimetilnafteno y el 2-metil-1-naftol, así como otros

naftenos metilados en la FSA que representan la mayor toxicidad (Falk-Petersen et al 1987).

El efecto producido por la FSA sobre la actividad de la ACHasa de *M. macrocopa* se observó que existe una estimulación de está a la concentración de 12  $\mu$ moles de ACH y posteriormente una inhibición a 14  $\mu$ moles de ACH. Comparando el resultado obtenidos con el trabajo desarrollado por Chamberst et al (1979), en donde ellos analizaron las diferentes actividades enzimáticas con petróleo crudo en oysters y shirimp en un ecosistema simulado observaron que existía una estimulación de la actividad de la ACHasa cuando los organismos eran expuestos durante un corto período de tiempo al petróleo crudo, se presentó un aumento de la actividad de la ACHasa, pero esta disminuyó cuando se prolongaba el tiempo de exposición. Ellos determinaron que el cambio en la actividad enzimática podría ser debido a condiciones de estrés producido por el petróleo, dado que al aumentar el tiempo de exposición este decrecía. Ellos proponían un mayor tiempo de exposición para determinar el verdadero efecto producido por el petróleo.

En nuestro caso el aumento de la actividad enzimática de la ACHasa podemos suponer que no puede ser debido a condiciones de estrés, debido a que trabajamos con homogenizado de cladocero. Sin embargo podría sugerir que este efecto a que el FAP estimula la sensibilidad de la máxima concentración trabajada se presenta una inhibición de la actividad, pero esta no es apreciada con claridad, por lo que conllevaría a realizar un ensayo con número mayor de concentraciones de ACH para dicho estudio.

Por otro lado Whipple Jeannett et al (1981) quien realizó una recopilación encontrando que existen compuestos aromáticos monocíclicos que a concentraciones subletales bajas pueden estimular el metabolismo, incrementando así la actividad enzimática.

Por lo que corresponde al efecto producido por el plomo sobre enzimas en sangre, diversos autores han reportado inhibición en la actividad de diferentes enzimas, determinando que la principal causa de este efecto es el ataque del plomo sobre los grupos sulfidrilos de las proteínas provocando destrucción de estas biomoléculas (45, 57). Muchas de estas enzimas son utilizadas en múltiples reacciones metabólicas además de las funciones neurotransmisoras como la ACHasa.

Por otro lado estudios experimentales muestran que el plomo produce cambios en los neurotransmisores, a través de la inhibición de las funciones colinérgicas, posiblemente por la reducción de calcio extracelular. Markovac y Goldstein (1988) encontraron que el plomo puede remplazar al calcio en la activación de las kinasas fosfolípidos-dependiente (protrina C kinasa) en venas del cerebro. Por otra parte Wong C.K. (1992) observó que en un estudio realizado con diversos metales pesados Cu, Ni, Zn y Cr en *M. macrocopa* producían inhibición de neurotransmisores probablemente debidos a la competición con el calcio.

Con respecto a los resultados del presente estudio la inhibición de la actividad de la ACHasa de *M. macrocopa* por el plomo, puede ser debida a uno u otro de los mecanismos anteriormente mencionados, o bien, a ambos. Esto se propone por que se puede observar que en las tres concentraciones

observándose una inhibición casi total. En este estudio se propone que los mecanismos de acción pueden variar con la concentración de Pb.

Los piretroides se consideran altamente tóxicos por diversos autores que concuerdan que la mayoría de piretroides actúan a nivel de receptores nicotínicos-ACH, GABA, y la ATPasa  $Ca^{2+}$ . Orchard y Osborne (1979) en un estudio realizado sobre la acción sobre la neurosecreción de neuronas en *carausius morosus*, observaron que la gran mayoría tenían acción directa sobre células neurosecretorias en el insecto. Ellos proponen que el efecto está asociado a la respuesta de mediadores dependientes de calcio. Feng Guo, Marion y Clark (1992) en un estudio sobre piretroides supresores de los neurotransmisores realizado con sinapsomas de insectos voladores, encontraron que la acción de depolarización se realiza a nivel de sinapsomas en los cuales tienen acción directa con los canales de sodio y calcio, siendo este el principal sitio de donde actúan la mayoría de los piretroides.

En nuestro estudio se observó que a todos los tratamientos con solfac en las diferentes concentraciones de sustrato (ACH) la actividad de la ACHasa fue inhibida, siendo más significativa a la concentración de 100 ppm, ya que dicha actividad disminuyó hasta un 30 %. Es probable que el solfac inhiba la actividad de la ACHasa, de que este insecticida compita con el calcio y por tanto bloquee la depolarización de la membrana presináptica.

Diversos investigadores le adjudican a los piretroides un alto poder tóxico. Side, Naqvi y Hawkis (1989) en un

estudio realizado con crustáceos que eran expuestos a diferentes insecticidas, observaron que el insecticida piretroide comparado con otros insecticidas de diversos orígenes (carbamatos, ciclodienos, organofosforados) presento mayor fuerza de inhibición de la ACHasa. Semliyem considera que los piretroides son poco tóxicos a causa de que su  $CL_{50}$  es de 0.33  $\mu\text{g}/\text{insecto}$  por aplicación tópica, además se considera poco persistente ya que este insecticida su acción dura aproximadamente 24 hr.

Diversos estudios sobre toxicidad de detergentes sobre organismo indican que las principales efectos son sobre tejido epitelial, ya sea en piel o a través del tracto gastrointestinal y branquias; Aun no se han reportado estudios sobre su acción específica sobre la ACHasa, pero existen evidencias de que este xenobiotico inhibe a AMPc, ATPasa, fosfatasa (Martínez et 1990). Así mismo, estas causan impacto sobre la pared y membrana celular provocando alteraciones en lípidos y proteínas a este nivel.

Por los resultados expuestos en el presente trabajo se ha observado que los detergentes tienen acción directa sobre la ACHasa de *M. macrocopa* cuando estos son expuestos a concentraciones de 250 ppm, la cual provoca una inhibición en su actividad. Por otro lado se observó que existe diferencia entre los dos detergentes propuestos DBSS y LAS entre los cuales muestran un comportamiento diferente sobre la inhibición de la ACHasa. Estos cambios sobre la calidad del agua bajo diferentes concentraciones de DBSS y LAS indican que la inhibición puede ser provocada por factores químicos de la composición de los detergentes.

Los detergentes inhiben a la ACHasa a todas las concentraciones de ACH, siendo más significativo el efecto presentado por bajas concentraciones de DBSS, sin embargo, a concentraciones altas de LAS, este produjo mayor efecto sobre la actividad de ACHasa que el DBSS.

El efecto producido por estos detergentes es posible que sea debido a que desnaturaliza a las enzimas, efecto estudiado por Vincenzini(1982). Este autor sugiere que la carga negativa del detergente, seguida por una cadena larga alifática, produce una selectiva acción inhibitoria en la actividad de diversas enzimas; así mismo, Sussman (1987), consideró que dicha acción esta sujeta a las concentraciones del detergente en el medio

Otro factor que es importante mencionar en el efecto producido por detergentes es la composición química de estas sustancias, ya que diversos estudios sobre la toxicidad de los detergentes se ha observado que estos tienen un comportamiento diferente dependiendo del tipo de detergente (anionico, catiónico, no iónico etc). En una recopilación hecha por Lewis M.A. (1991) muestra los diferentes efectos que tiene el alga al ser expuesto a varios tipos de detergentes tanto de semejante composición química como la de distinta estructura. Por otro lado, se debe de tomar en cuenta el factor de espacio molecular el cual puede ser otra de las causas que pueden provocar diferencias en las alteraciones de la actividad de ACHasa. Es probable que la diferencia en el efecto de acción de estos sea debido a que LAS es de cadena no ramificada a diferencia de DBSS



La ACHasa presenta como ya se menciona presenta dos sitios activos, uno aniónico y otro estearico, si consideramos que LAS y DBSS puedan interactuar con dichos sitios, es probable que si interactúan en el mismo sitio de acción de la enzima lo lleva a cabo con diferente afinidad.

Cabe otra probabilidad para explicar la diferencia en el efecto tóxico, que la interacción sea en diferente sitio de la enzima. Shain y Seegal (1991) en estudios realizados sobre la neurotoxicidad de policlorinados bifenólicos (PCBs) en relación a su estructura-actividad, han demostrado que compuestos PCBs dada su composición química pueden presentar diferencias entre los efectos neurotóxicos, ellos indican que la respuesta es debida al enlace que tienen estos compuestos sobre sitios activos en la molécula de la enzima, y que las diferentes sustituciones que tiene el cloro tienen efecto directo sobre el enlace con el sitio activo, con lo cual ellos proponen que dichas sustituciones provocan que se tengan sitios activos diferentes. Dada la estructura de la ACHasa posee dos sitios activos esta puede ser una de las causas por las cuales se presentan diferencias entre la inhibición de la ACHasa en donde se podría proponer que el DBSS y LAS actúen sobre sitios activos diferentes. Sin embargo, para comprobar que este tipo de interacción se lleva a cabo con los detergentes y la enzima, es necesario realizar otros estudios.

## 7. - CONCLUSIONES

- La evaluación de la actividad de la ACHasa en *Moina macrocopa* es muy rápido, sensible y fácil de realizar además de ser muy confiable, por lo que se propone para evaluar la calidad del agua que será utilizada para el cultivo del cladocero.

- El plomo y sulfac inhiben la actividad de la ACHasa a todas las concentraciones de ACH y a todas las concentraciones del toxon siendo más significativa a 100 ppm.

- El petróleo a 12  $\mu$ moles de ACH estimula la actividad de ACHasa.

- El DBSS y LAS inhiben a la ACHasa, siendo más significativo LAS a altas concentraciones y DBSS a bajas concentraciones.

- Se propone que LAS y DBSS pueden actuar de diferente forma dadas sus características fisicoquímicas de cada uno.

- Dada las características de la ACHasa, su evaluación la consideramos un útil parámetro para evaluar el impacto tóxico producido por diversos xenobióticos.

## A B R E V I A T U R A S

- ACH. Acetilcolina  
ACHasa. Acetilcolinesterasa  
CL<sub>50</sub>. Concentración Letal 50.  
DBSS. Duodecibencensulfonato de sodio  
FAP. Fracción acuosa de petróleo  
FMO. Función mixta oxidasa  
FSA. Fracción soluble de petróleo  
GABA. Acido gama aminobutilico  
KD. Kilodaltons  
LAS. Laurilsulfato de sodio  
m. moina  
 $\mu$ mol. micromol  
 $\mu$ s. microsegundo  
R.A. Reactivo analítico  
s. segundos  
SNC. Sistema nervioso central  
SNP. Sistema nervioso periférico  
TGI. tracto gastro intestinal  
( ) Número de referencia bibliografica

## GLOSARIO

Albañal.- Canal por donde son vertidos los desechos provenientes de las casas habitación principalmente de baños, wc, y cuartos de lavado.

Antropogénicas.- Son los cambios en el medio ambiente producidos por el hombre.

Bioindicados.- Son indicadores de organismos vivos para determinar la calidad del agua.

CL<sub>50</sub>.- Es la concentración de un contaminante en la cual provoca el cincuenta por ciento de las muertes en una población cuando este es expuesto intencionalmente.

Ecotoxicología.- Es la parte de la ecología que se encarga del estudio de los efectos provocados por los xenobióticos al medio ambiente.

Letalidad.- Es grado de mortalidad o muerte de los organismos que se presenta en una población.

Xenobiótico.- Es aquella sustancia endógena que provoca alteraciones en un organismo cuando este es expuesto a él.

## 8. - BIBLIOGRAFIA

1.- Atwoot Harold, "The biology of crustace" Neurobiology: estructura and funcion. Departamento de Zoology and Physiology, University of Toronto, Ontario Canada. Academic Press 3: 105-150 (1982).

2.- Astolfi, E Bruch. "Toxicologia de Pelgrado" libros López editores. Buenos Aires. Argentina 1982.

3.- Azov. Y. Shelef G, and Narkis N. Effect of hard detergents on alge in a high-rate-oxidation pond. Applied and enviromn. microbiology 491-492 (1982).

4.- Bernatt M. "The relative importance of lead as a marine pollutant" Divisione Protezione Ambiente. La Spezia Italia.

5.- Bradford, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical biochemistry 72: 248-254 (1976)

6.- Burnett M. and Patterson C.C. Analysis of Natural and industrial lead in marine ecosystems. Division Geological and planetary sciences, Pasadena California USA.

7.- Burnett M, Settle, D. and Patterson C.C. Impact of man coastal marine ecosystems. Division Geological and planetary sciences. Pasadena California USA.

8.- Carson, Bonnie L. and Ellisly, Harry  
"toxicology and biological monitoring of metals in humans"  
8a. Edición. Ed. Lewis publisher inc.

9.- Casarett and Doulls "The basic science of  
therapeutics" 12a. Edición. Ed. Haria.

10.- Chambers Janice E, Heitz R, McCorkle M and  
Yarbrough James. Enzyme activities following chronic exposure  
to crude oil in a simulate ecosystem. *Environm. Reseach* 20:  
133-139 (1979).

11.- Concovas. "A essentials molecular  
pharmacology backgroun for drugs desin" U.S.A. (1978)

12.- Cramyl, "toxicologia de pesticidas" Editorial  
pelicano, Bogota Colombia.

13.- Crowgill U.M, Emmel D.L. and Applegath. The  
influence of the water on reproductive success and chemical  
composition of laboratory reared populations of *Daphnia*  
*magna*. *Wat. Res.* 20: 317-323 (1986).

14.- Denner J.W. Seiner and Hermens J.L. Growth of  
the *Daphnia magna* exposed to mixtures of chemicals with  
diverse modes of accion. *Ecotoxicol. and enviromn. safety*  
15: 72-77 (1988).

15.- Falk-Petersen, Inger-Britt and Elin. Acute toxicity test of the effects of oils and dispersants on merine fish embryos and larvae-a review. *Surcia* 72: 411-413 (1987).

16.- Feng Guo, Jaques, Marion R. and Marshall Clark J. Suppression of pyretroid-dependent neurotransmitter from synapsomas of knockdown-resistant house files under pulsed-dopolarization concditiones during continuous perfusion. *Pesticide biochemistry and physiology*. 42: 64-67 (1992).

17.- Gill, Tendra S. Jaishree Pande and Sudha Lai. In vivo tissue enzyme activites in rosy barb (*Barbus conchoniuss* Halminton) Experimentally expose to lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 939-946 (1991).

18.- Goodman and Gilman's "The pharmacological basis of terapeutics" 8a. edición. Ed Medica panamericana.

19.- Gutierrez Castrejon "Detergentes y la contaminación ambiental" Laboratorio de ecologia microbiana ENCB.

20.- Gutierrez V.A. "Aspectos biológicos sobre el cultivo de *Moina macrocopa*" Escuela Nacional de Ciencias Biologicas. Dpto de Biología. México D.F.

21.- Hayes. "Handdbook of pesticide toxicologia de pesticidas" volumen 2 Academic Press Inc 1984.

22.- Hazary Lai, Virendra Misra, Viswanathan P.N. and Krishna C.R. Comparative studies on ecotoxicology of synthetic detergents. *Ecotoxicol. and enviromn. safety* 7: 538-545 (1983).

23.- Hestrin, Salomon. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivates with hidroxilamine, and its analitical applications. *J. Biochemical* 249-259 (1949)

24.- IPCS (International programes on chemical safety enviromental heath) criterio 20 selected petroleum products, World health organizacion, Genova 1982.

25.- Ivleva, I.V. "Mass cultivation os invertebrates. Biology and Methods" Academic of science os the USSR. Jerusalem.

26.- Lee, Richard F. Stolzenbach, Singer, Sara and Tenore Kenneth. Effects of crude oil on growth and mexed fincion oxigenase activity in polychaetes, *nereis* sp. *Academic. Pres* 323-333 (1981).

27.- Lee, W.Y. Wintres K. and Nicol A.C. The biological effects of water-soluble fraccions of no. 2 fuel oil on the planktonic shrimp, *Lucifer faxoni*. *Environ. Pollut.* 15: 167-183 (1978).

28.- Lewis M.A. Chronic toxicites of suefactants and detergent builders to algae: A review and risk assesment. *Ecotoxicol. and enviromn. safety* 20: 123-140 (1991).



29.- Litter, Manuel. "Farmacología experiemntal clinica". 7a. Edición. Ed "el ateneo" Argentina.

Marin, Maria G. Bressan, Monica and Brunetti Ricardo. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on two marine benthic oganisms. *Acuatic Toxicology* 19: 241-248 (1991).

30.- Marka Brainca, Zdenks Konrad. "lead in the marine enviroment" Ed. Pergamon Press, Oxford Englan. 1a edicion 1980.

31.- Mason, C.F. "Biología de la contaminación de agua dulce" Ed. Alambra. Mexico D.F.

32.- Martinez Tabche, L. Santiago, B.V. "Efecto tóxico del duodecilibencensulfonato de sodio sobre branquias e hígado de peces Tilapia". *Acta Mexicana de ciencias y tecnología* Vol. VII, no. 25 pp 67-72 (1990)

33.- Orchard I. and Osborne M.P. The accion of insecticides on neurosecretory neurons in the stick insect, *Carausius morosus*. *Pesticide Biochemistry and physioligy* 10: 197-202 (1979).

34.- Payne, Jerry F. Fancey, Linda L. Rahimtula Anver and Porter Edward L. Review and persdpective on the use of mixed-funtion oxigenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem.* 86: 233-245 (1987).

35.- Rehwoldt, Robert, Kelley, Edwina and Mahoncy Mark. Investigations into acute toxicity and some chronic effects of selected herbicides and pesticides on several fresh water fish species. Bull. Environm. contam. toxicol. 18: 361-365 (1977).

36.- Rodriguez Santana, Eduardo "Apuntes de geologia del petróleo" Facultad de Ingenieria UNAM. (1986).

37.- Rossi S.S, and Anderson J.W. Petroleum hydrocarbon resistance in the merine worm *Neathes arenaceodentata* (polychaeta: Annelida) induced by chronic exposure to no. 2 fuel oil. Bull. Enviromn. Contam. Toxicol. 20: 513-521 (1978).

38.- Sastry A.N. "Aplication of biochemical and physiological responses to water quality monitoring" Academic Press Inc. 1981.

39.- SEDUE (Secretaria de desarrollo urbano y ecologia). Control de la contaminación del agua programa nacional de capacitacion ambiental, 1981.

40.- Syde M. Naqvi and Hawkins. Responses and LC50 values for selected microcrustaceans exposed to Spartang, Malation, Sonar g, Weedtrine-Dg and Oust g pesticides. Bull. Environ Toxicol. Contam. 25: 386-393 (1989).

41.- Schoor W. Peter and Brausch James. The inhibition of acetylcholinesterase activity in Pink shrimp (*Penaeus duorarum*) by methyl paration and its oxon. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 9: 599-605 (1980).

42.- Shain William, Bush Brian and Seegal Richard. Neurotoxicity of polichlorinate biphenyls: structure-activity relationship of individuals congeners. Toxicology and applied pharmacology 111: 33-42 (1991).

43.- Sheehan, P.J. Miller G.C and Borderdeau. "Effects of popollants at the ecosystem level" Ed. SCOPE. Ottawa Canada. 1980.

44.- Southiwck C.H. "Ecology and quality of our enviromental" 2a. Edición. D. Van Nostrand Co. New York 1976.

45.- Stanley E. Mancha. "Toxixocol Chemisty" A guide to toxic sustancias in chemistry. Ed. El manual moderno.

46.- Sussman M. Harrys J.B. Smit T.A. "Selective reversible inhibition of the lactose phosphotranferase system of staphylococcus aereus by duodecylsulphate and deoxycholate" Arch Bioph. 182: 134-137 (1977)

47.- Tarshis. I. Barry. Uptake and depuration of petruleum hidrocarbons by carfish. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 10: 79-86 (1981).

48.- Tuesdale. G.A. "Contaminación del agua por detergentes y productos químicos y su abastecimiento. Subsecretaría de mejoramiento ambiental S.S.A. México D.F. 1972.

49.- Turk. A. Turk J. "Ecología-contaminación y medio ambiente" Editorial Interamericana, México D.F. 1972.

50.- Van Der Well H. and Welling W. Inhibition of acetilcolinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: Methodological aspects. *Ecotoxicol. and Environm. Safety* 17: 205-215 (1989).

51.- Vernberg, Jhon. Calabrese Anthony and Frederick P. "Biological monitoring of Marine pollutants" Ed. Academic Press. New York 1981.

52.- Viscaino Murray Fransisco "La contaminación en México" Fondo de cultura económica México D.F. 1986.

53.- Vincenzini M.T. "Specific interacción some enzymes and sodium dodecylsulphate life" *Sciences* 31: 463-470 (1982).

54.- Willber Charles A. "The biological aspects of water population" Ed. Springfield Illinois, 2a Edicion. USA. 1971.

55.- Whipple. Jannette A. Eldridge Maxwell B. "An ecological perspective of the effects of monocyclic aromatic hidrocarbons on fishes" Academic Press. 1981.

56.- Wong, C.K. Effects of chromium, copper, niquel and zink on survival and feeding of the cladoceran *Moina macrocopa*. Bull. Enviromn. Contam. Toxicol. 49: 593-599 (1992).

57.- Wood J.M. "lead in the marine enviromental: Some biochemical Considerations" Freshwater Biological Institute, Universite Minesota U.S.A. 1987.

58.- Yacuta OrII, Masao and Machiko "Molecular Arquitectura of citocromo Oxidase and Its transición on treatment with alkali or dodecyl sulfate" J. Bochem. 81, 505-517 (1977).