



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“RESPUESTA DE *Colpoda cucullus* A EXPOSICIONES
CONTROLADAS DE DDT PARA SU POSIBLE USO EN LA
CONFORMACIÓN DE UN BIOSENSOR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CITLALY MARISOL HERNÁNDEZ ARRIAGA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB. ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ

VOCAL: DRA. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ

SECRETARIO: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

1er. SUPLENTE: QFB. RUTH EDITH MARTIN FUENTES

2° SUPLENTE: DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
EXPERIMENTAL. FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM**

ASESOR DEL TEMA: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

SUSTENTANTE: CITLALY MARISOL HERNÁNDEZ ARRIAGA

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Graficas.....	iv
Índice de Tablas.....	iv
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 ABREVIATURAS.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 <i>Colpoda cucullus</i>	6
2.1.1 Taxonomía de <i>Colpoda cucullus</i>	9
2.1.2 Estudios con <i>Colpoda sp</i>	10
2.2 DDT (Dicloro difenil tricloro etano)	11
2.2.1 Degradación y biotransformación del DDT.....	12
2.2.2 Efectos Tóxicos del DDT	15
2.2.3 Usos, tiempo de vida media y afinidad del DDT a suelos.....	16
2.2.4 Monitoreo ambiental del DDT	17
2.2.5 Regulación Jurídica Ambiental del DDT.	18
2.3 Biosensores	21
2.3.1 Componentes	22
2.3.2 Características	24
2.3.3 Biosensores ambientales	25
2.3.4 Ejemplos de biosensores	26
2.4 Microscopía de Fluorescencia.....	27
2.4.1 Fluorocromos (Fura 2-AM).....	29
2.4.2 Proceso de quelación del FURA 2-AM.....	31
2.4.3 Factores que afectan la fluorescencia	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo General	35
3.2 Objetivos Particulares	35
3.3 Hipótesis	36

3.4 Justificación	36
3.5 Alcances del Trabajo	36
3.6 Desarrollo general y estrategia de trabajo.....	37
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARTE 1.	39
Efectos toxicológicos del DDT en <i>Colpoda cucullus</i> (cepa silvestre y de referencia).....	39
4.1 Obtención de las células tróficas de <i>C. cucullus</i>	39
4.2 Solubilidad del DDT	39
4.3 Preparación de stocks y diluciones de DDT	40
4.4 Bioensayos de toxicidad <i>C. cucullus</i> – DDT	41
4.5 Determinación de cambios morfológicos sufridos durante la exposición al DDT	41
4.6 Ensayos para establecer el efecto del DDT en el tiempo de duplicación de <i>C. cucullus</i>	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARTE 1.	43
Efectos toxicológicos del DDT en <i>Colpoda cucullus</i> (cepa silvestre y de referencia).....	43
5.1 Desarrollo de <i>C. cucullus</i>	43
5.2 Selección del disolvente recomendable para la solubilizar el DDT	44
5.3 Obtención de la CL ₅₀ para DDT	46
5.4 Cambios morfológicos sufridos durante la exposición al DDT.....	48
5.5 Efecto del DDT en el tiempo de duplicación de <i>C. cucullus</i>	50
6. CONCLUSIONES PARTE 1	52
Efectos toxicológicos del DDT en <i>Colpoda cucullus</i> (cepa silvestre y de referencia).....	52
7. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Parte 2	53
Uso de <i>Colpoda cucullus</i> como biosensor a contaminación por DDT mediante microscopia de fluorescencia	53
7.1 Tinción por fluorescencia de <i>C. cucullus</i>	53
7.2 Efecto del DDT sobre la intensidad de fluorescencia en el protozoo <i>C. cucullus</i>	53
7.3 Construcción de la Curva Patrón DDT (mg/mL) vs Intensidad relativa	54
7.4 Interpolación de las muestras problema en el modelo experimental y su comparación estadística con la concentración de preparación	55
8. Resultados y Discusión Parte 2	56
Uso de <i>C. cucullus</i> como biosensor a contaminación por DDT mediante microscopia de fluorescencia	56
8.1 Tinción fluorescente de <i>C. cucullus</i>	56
8.2 Efecto del DDT sobre la intensidad de fluorescencia en el protozoo <i>C. cucullus</i>	57
8.3 Pérdida de la intensidad de fluorescencia respecto a concentraciones variables de DDT	58

8.4 Interpolación de las muestras problema en el modelo exponencial.	62
9.CONCLUSIONES PARTE 2	65
Uso potencial de <i>C. cucullus</i> como biosensor a contaminación por DDT mediante microscopia de fluorescencia	65
10. Conclusión General	65
11.Perspectivas futuras	65
Bibliografía	67

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología de <i>C. cucullus</i> (Rüdiger, 2006.).....	7
Figura 2. Proceso de división de <i>C. cucullus</i> (Kidder, 1990.).....	8
Figura 3. Árbol filogenético basado en la región 18 S Ribosomal. (Castro <i>et al.</i> , 2012.).....	10
Figura 4. Productos de degradación del DDT (Aislabie <i>et al.</i> , 1997)	12
Figura 5. Deshalogenación reductora.	13
Figura 6. Deshidrogenación del DDT	13
Figura 7 . Biotransformación del DDT en mamíferos (Prado <i>et al.</i> , 2002)	14
Figura 8. Esquema de un biosensor (Castro <i>et al.</i> , 2007).....	22
Figura 9. Observación en el Microscopio de fluorescencia (Davison M, 2009).....	28
Figura 10. Estructura molecular de FURA 2-AM	29
Figura 11. Actividad de los compuestos AM.	30
Figura 12. Estructura desarrollada del Fura 2-AM	31
Figura 13. Sitos de quelación del Fura 2-AM.....	32
Figura 14. Esquema general del trabajo experimental.	38
Figura 15. Células tróficas de <i>C. cucullus</i>	44
Figura 16. Medición del protozoo en campo claro a 40x.....	48
Figura 17. Modificaciones morfológicas sufridas por el protozoo ante la exposición al DDT.....	49
Figura 18. Proceso de división de <i>C. cucullus</i> . Campo claro 40x.....	50
Figura 19. Ejemplo de los histogramas obtenidos en base a las imágenes muestra (1 y 2) a partir de los cuales se cuantificó la intensidad de fluorescencia de <i>C.cucullus</i>	60

Índice de Graficas.

Gráfica 1. Comportamiento de los bioensayos de los diferentes disolventes en la cepa silvestre	45
Gráfica 2. Efecto letal del DDT sobre el protozoo A) Cepa silvestre. B) Cepa ATTC®30916	46
Gráfica 3. Obtención de la CL ₅₀ , CL ₁₀ y CL ₉₀ par <i>C. cucullus</i>	47
Gráfica 4. Intensidad absoluta vs DDT mg/mL	61
Gráfica 5. Intensidad relativa vs DDT mg/mL	61
Gráfica 6. Intensidad absoluta vs DDT mg/mL. (Modelo exponencial)	63
Gráfica 7. Restricción del aparato detector.	64

Índice de Tablas.

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>C. cucullus</i> (Castro <i>et al.</i> , 2012)	9
Tabla II. Características fisicoquímicas del DDT	12
Tabla III. Técnicas de análisis multiresiduos utilizadas para el monitoreo de DDT	17
Tabla IV. Propiedades fisicoquímicas de Fura 2-AM	30
Tabla V. Diluciones de los diferentes disolventes empleados en la determinación de la CL50.	40
Tabla VI. Desarrollo de <i>C. cucullus</i> en las diferentes infusiones de trabajo y su limpieza	43
Tabla VIII. Solubilidad y CL ₅₀ de los diferentes disolventes para <i>C. cucullus</i> (cepa silvestre)	44
Tabla IX. Efecto tóxico cuantitativo del DDT sobre <i>C. cucullus</i>	47
Tabla X. Influencia del DDT en el tiempo de duplicación de <i>C. cucullus</i>	51
Tabla XI. Diluciones prueba del fluorocromo para el cargado de las células	56
Tabla XII. Modificación cualitativa de la intensidad de fluorescencia al elevar la concentración de DDT.	57
Tabla XIII. Influencia del DDT en la fluorescencia emitida por <i>C. cucullus</i>	58
Tabla XIV. Intensidad de fluorescencia vs Concentración de DDT (mg/mL)	61
Tabla XV. Intensidades relativas y absolutas para las diferentes muestras problema	62
Tabla XVI. Comparación entre la concentración real de la muestra y la obtenida por interpolación en la curva patrón.....	63

RESUMEN

Colpoda cucullus es un protozoo ciliado cosmopolita encontrado especialmente en suelo y agua. Debido a su fisiología, bioquímica y respuesta toxicológica que presenta a modificaciones ambientales puede relacionarse con organismos de mayor complejidad incluido el ser humano.

Se sabe que, la exposición al dicloro difenil tricloroetano (DDT) plaguicida organoclorado persistente con alto grado de bioacumulación y biomagnificación origina en *C. cucullus* alteración en el tiempo de duplicación, morfología y daño a estructuras celulares, sin embargo, no se conoce al detalle el mecanismo causante de estos efectos dañinos.

Mediante un análisis PROBIT se calculó la CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} , para una cepa silvestre y una cepa de referencia, encontrándose que esta última presenta una mayor sensibilidad al plaguicida, por lo tanto, puede ser usada como bioindicador y/o biosensor a DDT.

En función de la concentración de DDT, *C. cucullus* presenta cambios que van desde afectación de su movimiento ciliar (0.18 mg/mL), concentración más alta a la que no se observa efecto (0.5 mg/mL), concentración letal media (1.1 mg/mL) y lisis celular (4 mg/mL)

Para cuantificar la respuesta toxicológica se empleó la técnica de microscopía de fluorescencia acoplada a un programa de análisis de imagen, lográndose obtener un modelo matemático que relaciona la intensidad de la fluorescencia con la cantidad de DDT de exposición. Este modelo resultó ser confiable y representativo del efecto tóxico, por consiguiente, puede ser incorporado en la implementación u optimización de un biosensor ideal.

Por lo tanto, *C. cucullus* es un elemento biológico útil en la cuantificación de compuestos de alto grado contaminante y limitada degradación como el DDT, relacionando parámetros morfo-fisiológicos y de mortalidad dedicados al establecimiento de niveles tóxicos o letales a nivel de laboratorio.

1. INTRODUCCIÓN

El creciente aumento de sustancias tóxicas en el ambiente ha creado la necesidad de conocer los niveles de contaminantes, prevalecientes en agua, suelo y aire. Para lo cual, se han utilizado bioindicadores, que son especies seleccionadas por su sensibilidad a la presencia de contaminantes debido a su especificidad y fácil monitoreo.

Para que un microorganismo sea empleado como indicador se requiere del conocimiento previo de su biología incluyendo su ciclo de vida, composición comunitaria bajo condiciones normales y sus variaciones naturales, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una perturbación ambiental (Vázquez. *et al.*, 2006).

Los biosensores se han desarrollado como métodos cuantitativos o semicuantitativos integrados a programas de control de contaminantes implementados en sistemas de seguridad ambiental.

Desde el siglo pasado y hasta fines de los años 50's, el paludismo fue una de las principales causas de muerte en México. Por ejemplo, en 1913 esta enfermedad provocó la muerte del 20% de los habitantes de la Ciudad de México. En este escenario, surge el DDT, cuya aplicación en el Programa Antipalúdico se generalizó a partir de 1956.

El DDT es un insecticida organoclorado cuyo principal uso en control del paludismo y dengue a través del exterminio de los mosquitos vectores. Poco después, su aplicación se amplió al campo agrícola y ya para la década de los 60's, el 80 % de la producción de DDT era empleada en el cultivo del algodón principalmente (Botello A. *et al.*, 1996). En la actualidad, el uso del DDT ha disminuido de forma importante y a partir de 1998, los insecticidas de selección para el control del paludismo son los piretroides, insecticidas menos persistentes (Deogracias. *et al.*, 2009).

Debido a sus características fisicoquímicas, el DDT puede transportarse por grandes distancias y ello ha originado su distribución global. Se ha encontrado DDT y sus metabolitos

DDD y DDE aún en lugares donde el insecticida no ha sido aplicado como ocurre en el Ártico.

El efectos que tiene el DDT sobre protozoos ciliados como *Colpoda cucullus* es la afectación principal del potencial de membrana celular mediante bloqueo o inactivación de los canales de Na^+ , Ca^{2+} dependientes de voltaje causando fuga de iones, también afecta otras funciones ligadas a la membrana, tales como la fosforilación oxidativa provocando deformación celular, daño mitocondrial, el almacenamiento del plaguicida en vacuolas digestivas y finalmente, la lisis del ciliado. Esta respuesta se puede monitorear mediante técnicas microscópicas de fluorescencia, empleando un fluorocromo capaz de unirse a los iones libres Na^+ , K^+ y Ca^{2+} facilitando la determinación cuantitativa del DDT presente en muestras a nivel laboratorio y posteriormente en ambientales de agua (Klaassen, 2005).

1.1 ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection.

CL: Concentración letal.

DDD: Diclorodifenildicloroetano.

DDE: Diclorodifenildicloroetileno.

DDT: Diclorodifeniltricloroetano.

LOEC: Concentración más baja a la que se observa efecto.

NOEC: Concentración más alta a la cual no se observa efecto.

UT: Unidad toxicológica.

2. MARCO TEÓRICO

Al incrementarse el uso de compuestos recalcitrantes en el medio ambiente cuyo resultado dañino se desconoce en pequeñas especies de eucariontes o procariontes se tiene la necesidad de conocer el efecto toxicológico sobre estos microorganismos para poder extrapolar los hallazgos a organismos de orden superior y así no solo monitorear a la toxicidad de estos compuestos, si no, también el estudio del comportamiento biótico dependiendo de la degradabilidad del contaminante.

En este tipo de estudios encontramos principalmente:

Los bioensayos que fueron la primera herramienta biológica en ser aplicada al área ambiental. Básicamente constituyen procedimientos que emplean un organismo vivo para estimar la toxicidad potencial de una sustancia o de una matriz contaminada.

Un bioensayo se define genéricamente como un experimento enfocado a investigar el papel tóxico de alguna sustancia en un contexto biológico, ecológico o evolutivo empleando organismos o sistemas vivos (Castro et al., 2007).

En sus inicios se emplearon como organismos de prueba: mamíferos, aves y peces. Sin embargo, actualmente los procedimientos normalizados dan preferencia al uso de plantas y microorganismos (algas, levaduras y bacterias) (Castillo, 2004, González *et al.*, 2005).

La obtención de resultados concluyentes en los bioensayos están relacionados con el tiempo de exposición, naturaleza del tóxico y respuesta de la especie.

Con el fin de examinar los diferentes efectos asociados al tiempo de exposición los estudios toxicológicos se dividen en tres categorías:

- Agudos: los cuales implican una sola administración de la sustancia química bajo control de una prueba.
- A corto plazo (subagudos): en los cuales intervienen aplicaciones repetidas en un periodo de 10% de la duración de la vida de la especie.
- A largo plazo: que implica administraciones repetidas en un periodo de toda la vida de la especie prueba o cuando menos una fracción importante de ella.

La especie de prueba debe ser preferentemente económica, de fácil adquisición y manejo. Los cuales no solo deben ser observados para conocer el tiempo y número de muertes, sino también para conocer los efectos autónomos, centrales y de conducta, incluyendo comienzo, intensidad y duración del efecto.

El producto químico se puede clasificar según su toxicidad relativa en súper tóxico, extremadamente tóxico, altamente tóxico, moderadamente tóxico, ligeramente tóxico y prácticamente no tóxico.

Por lo general los compuestos deben administrarse por la misma vía por la cual los organismos superiores quedarían expuestos. Cuando se necesite mezclar el tóxico con un diluyente el medio *per se* debe de tener poco o ningún efecto desfavorable sobre el organismo prueba, y no debe reaccionar con la sustancia en estudio.

2.1 Colpoda cucullus

Colpoda cucullus es un protozoo ciliado con un tamaño general de 60 a 80 x 40 a 60 μm . De forma arriñonada, excavada en la apertura oral, con mitades anterior y posterior aproximadamente iguales, ligeramente aplanado (Figura 1). Cuenta con un macronúcleo globular y elipsoideal de ubicación variable, un micronúcleo de 3 x 2 μm de tamaño, por lo general, adjunto al macronúcleo. Se moviliza a través de vacuolas contráctiles y libera sus productos de desecho por un poro excretor ubicado en extremo posterior del protozoo. Su citoplasma es incoloro y sin inclusiones cristalinas; sus vacuolas digestivas miden de 5-8 μm . Es un organismo bastante móvil cuyos cilios tienen una longitud aproximada de 10 μm .

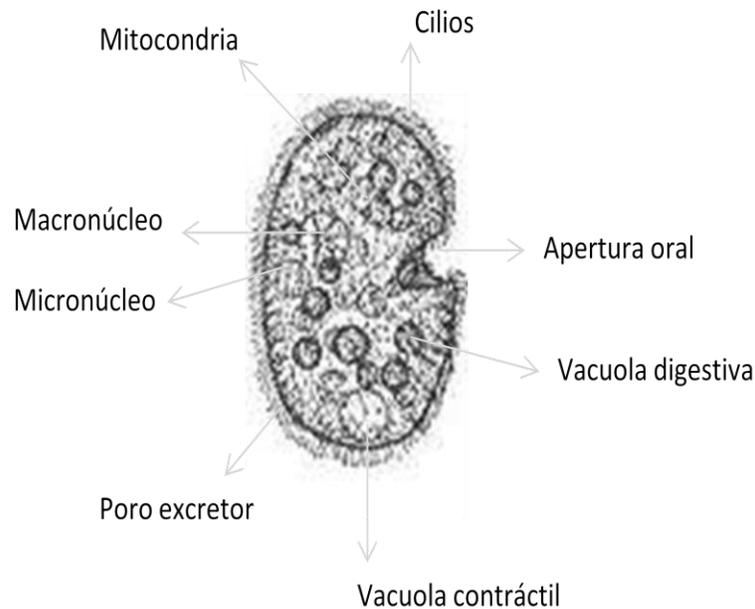


Figura 1. Morfología de *C. cucullus* (Rüdiger, 2006.)

Colpoda cucullus es considerado un protozoo de suelo superficial aunque también se ha encontrado en lagos, aguas termales y suspendido en aire en forma de quiste. Se encuentra principalmente cerca de materia orgánica en descomposición o asociados a vegetación primaria (Müller. 1970).

Su ciclo de vida dispone de dos formas: Trofozoito y quiste de resistencia. Las células de *C. cucullus* recién exquistadas miden aproximadamente 40 μm y tienen sus vacuolas digestivas vacías las cuales inmediatamente empiezan a engullir materia orgánica, bacterias o pequeños protozoos de los cuales se alimentan, hasta que se tornan esféricas y compactas, las cuales se distribuyen alrededor del citoplasma. El tamaño alcanzado por el ciliado posterior a este proceso es de 50 – 70 μm llegando a tener hasta 200 vacuolas.

Pocas horas después del exquistamiento el trofozoito comienza a perder su movimiento ciliar y su forma característica por una esférica llamada quiste reproductivo el cual al romperse da origen a cuatro células hijas de menor tamaño, para iniciar el ciclo nuevamente; esto se repite de tres a cuatro veces durante 24 horas (Figura 2).

El proceso de reproducción se puede ver retrasado por condiciones ambientales, contaminantes presentes o la falta de nutrientes en el medio, por lo que, se observará un decremento de quistes reproductivos y de la actividad del protozoo.

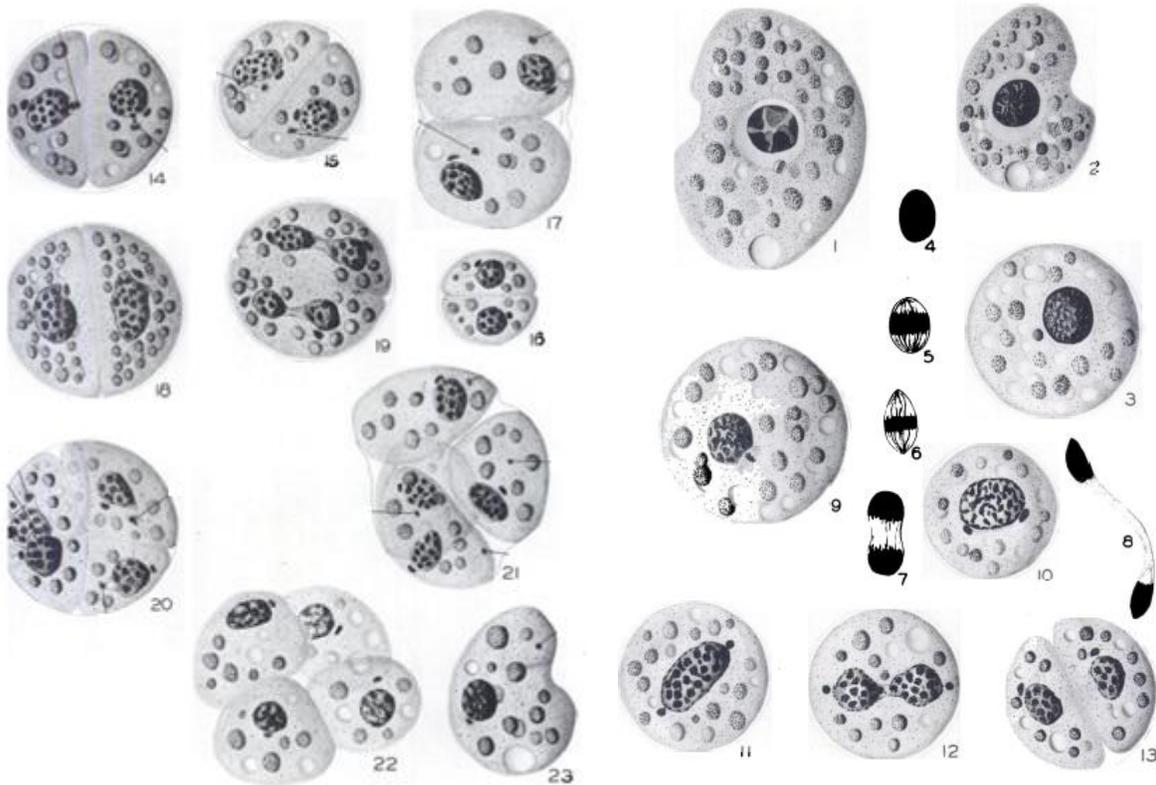


Figura 2. Proceso de división de *C. cucullus* (Kidder, 1990.)

La formación del quiste de resistencia se ve inducido por la exposición del protozoo a condiciones adversas como desecación, la falta de reemplazo del medio de sostenimiento o la presencia de contaminantes. Durante esta etapa la membrana del microorganismo se torna esférica, los organelos se indiferencian y compactan en un aparato nuclear dejando el citoplasma como un material granular. La membrana celular se engruesa y contrae por lo que quiste de resistencia siempre es mucho más pequeño que las células tróficas o el quiste reproductivo (Kidder *et al.*, 1980).

Colpoda cucullus tiene una gran capacidad de adaptarse a variaciones ambientales ya que puede producir el quiste de resistencia y células tróficas muy rápidamente.

El proceso de exquistamiento a partir de un quiste de resistencia tiene una duración aproximada de siete horas mientras que el de crecimiento y reproducción de los colpodidos oscila en seis horas.

2.1.1 Taxonomía de *Colpoda cucullus*

Secuenciación genética de la cepa silvestre.

En el trabajo de Castro *et al.*, 2012, se muestra la relación evolutiva de *Colpoda cucullus* con otras especies, al secuenciar la cepa silvestre de trabajo mediante técnicas de biología molecular básica como PCR en la región 18S ribosomal del RNA se amplificó usando ColpF (5'-ACCATACATATGCATGCTGT (C/A) AAACCT (G/A) ACTT) y Colp-R (5'-ATCATAGATGCTTGCACA (T/C) AAAGTCCCTC) como cebadores para amplificar una longitud de 1190 pb.

La identificación molecular de la especie silvestre fue confirmada por la comparación molecular de las secuencias resultantes de ambas: la cepa aislada silvestre y la ATCC 30916.

Mediante la información genética proporcionada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), y usando el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) se determinó la identidad de secuencias entre los especímenes. Ambas secuencias de la cepa silvestre y ATCC se alinearon con el software CLUSTAL W, BIOEDIT paquete, versión 7,09 (Hall, 1999). El MEGA software versión 4,0 (Tamura *et al.*, 2007) se utilizó para construir un árbol filogenético (Figura 3). En la tabla I se presenta a detalle la clasificación taxonómica de *C. cucullus*.

Tabla I. Clasificación taxonómica de *C. cucullus* (Castro *et al.*, 2012)

Dominio	<i>Eucaryota</i>
Phylum	<i>Ciliophora</i> Doflein, 1901
Subphylum	<i>Intramacronucleata</i> Lynn, 1996
Clase	<i>Colpodea</i> Small y Lynn, 1981
Orden	<i>Colpodida</i> Puytorac <i>et al.</i> , 1974
Familia	<i>Colpodidae</i> Bory y St. Vicent, 1826
Género	<i>Colpoda</i> Müller, 1773
Especie	<i>C. cucullus</i> Müller, 1773

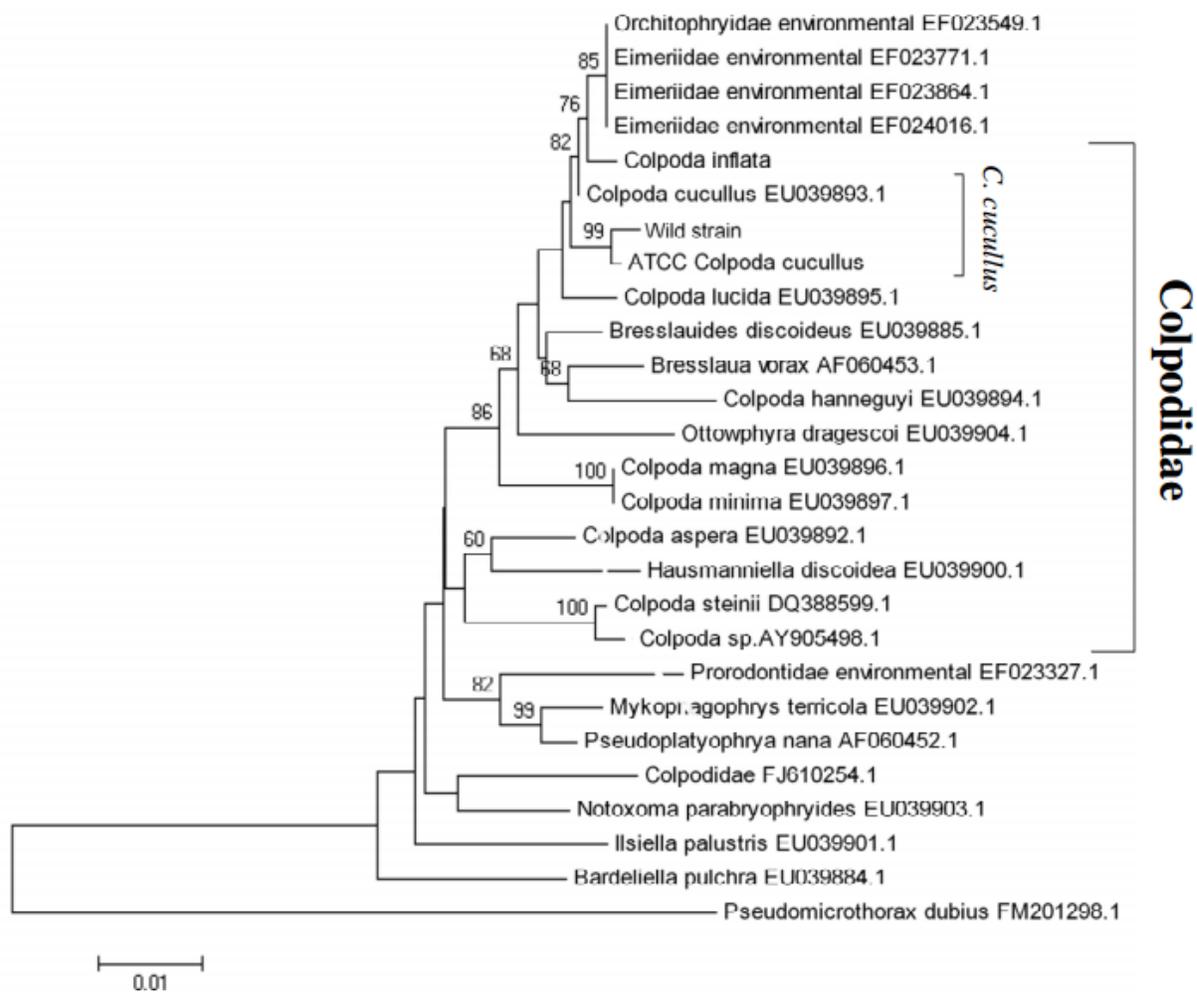


Figura 3. Árbol filogenético basado en la región 18 S Ribosomal (Castro *et al.*, 2012.)

2.1.2 Estudios con *Colpoda* sp

Al estudiar a *Colpoda* sp bajo el microscopio estereoscópico se observan estructuras claramente visibles y al ser un microorganismo que carece de pared celular en estado trófico, cuenta con una sensible membrana que le permite una rápida penetración de los compuestos químicos, gracias a eso el protozoo ha sido empleado en numerosos estudios ambientales como:

- Indicadores edáficos en proceso de desertificación (Costa *et al.*, 2007): Sobre esta base se han estudiado las características y evolución de suelos degradados producto de actividades agrícolas, relacionando comunidades vegetales con el grado de erosión del

suelo las especies colpódidas presentes. Donde en los peores suelos se encontró vegetación más degradada y a la vez una mayor riqueza de ciliados.

- Efecto de compuestos organofosforados encontrados en suelo sobre *Colpoda inflata*. Trielli *et al.* (2009) encontraron que 3 diferentes plaguicidas (basudin, cidual y fenix) afectan la viabilidad del protozoo, su proceso de exquistamiento, su división y la cromatina encontrada en el citoplasma; principalmente por la inhibición de la enzima colinesterasa implicada en los procesos vitales del ciliado.
- Toxicidad aguda de metales pesados en protozoos encontrados en agua dulce. En los géneros *Colpoda* y *Euplotes*, objetos experimentales del estudio de Trielli *et al.* (2006) se observó el bloqueo de enzimas vitales en el metabolismo, implicadas en la síntesis de proteínas de bajo peso molecular, aunado a la formación de vesículas en las que los ciliados englobaban los metales (Pb, Cr, Cd, Ni, Cu) como un mecanismo de tolerancia, desde concentraciones de 0.1 hasta 20 mg/L.

2.2 DDT (Dicloro difenil tricloro etano)

El DDT (2,2-bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) es un plaguicida organoclorado, sintetizado por Zeidler en 1874 cuyas propiedades insecticidas fueron descubiertas hasta 1939. Este compuesto es muy estable y sus características lo hacen persistente en el ambiente, facilitando su dispersión, bioacumulación y biomagnificación a través de redes tróficas (Albert, 1990; Albert *et al.*, 1996). En la tabla II se presentan algunas propiedades del DDT.

Tabla II. Características fisicoquímicas del DDT

Fórmula	C ₁₄ H ₉ Cl ₅
Peso molecular	354.49
Punto de fusión	260.90 °C
Solubilidad en agua	3.40 ppb
CAS	50-29-3
Categoría Toxicológica	II
Clasificación	Organoclorado
Tipo de plaguicida.	Insecticida

2.2.1 Degradación y biotransformación del DDT

El DDT puede degradarse por reacciones químicas de fotólisis (degradación por acción de la luz), de fotodegradación (interacción con radicales hidroxilo) y deshalogenación a DDE, y DDD (Figura 4).

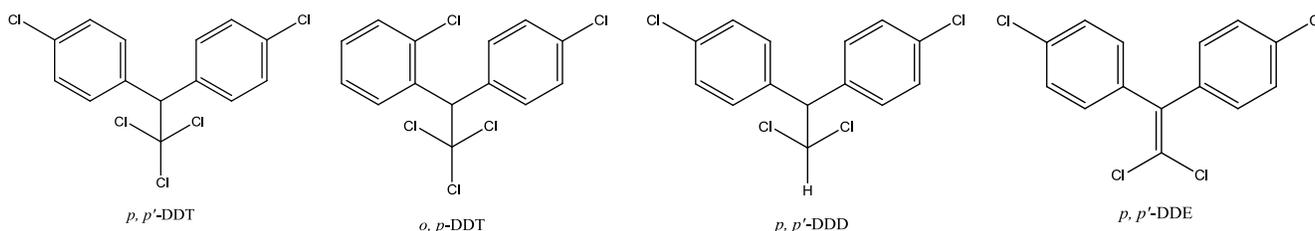


Figura 4. Productos de degradación del DDT (Aislabe *et al.*, 1997)

Biológicamente el DDT también se puede degradar siguiendo algunas de las siguientes reacciones:

- **Deshalogenación reductora:** Esta reacción es muy importante en la biotransformación de xenobioticos que tienen algún halógeno en su estructura. Las deshalogenaciones pueden ser reductoras, oxidativas o deshidrohalogenaciones

donde se pierde un halógeno y un hidrógeno del carbono adyacente para dar paso a la formación del doble enlace (Ballschmitter y Wittlinger. 1991) (Figura 5).

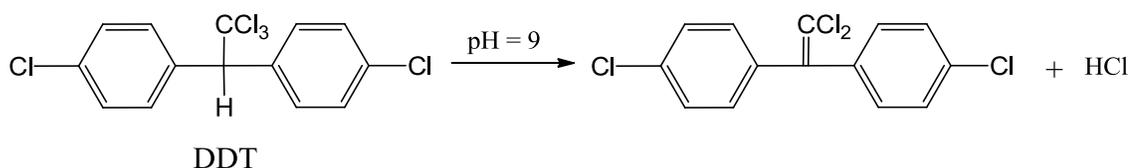


Figura 5. Deshalogenación reductora.

- Deshidrohalogenación: El pp'-DDT sufre una reacción de deshidrohalogenación hasta pp'-DDE por la DDT-dehidroclorinas dependiente de glutatión reducido (GSH) pero no lo hace con el o,p-DDT lo que sugiere que actúa estereoespecíficamente (Figura 6).

En caso de los hidrocarburos halogenados, la deshalogenación puede transcurrir por una vía oxidativa o reductora; en muchos casos catalizada por enzimas CYP-450.

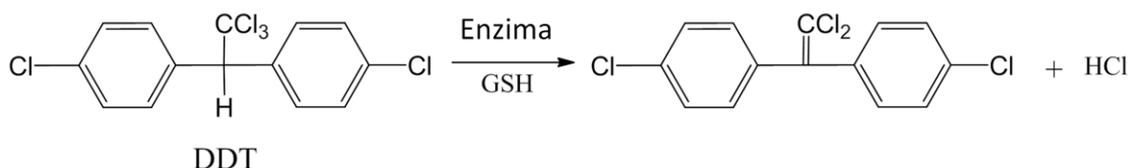


Figura 6. Deshidrogenación del DDT

Este mecanismo involucra la abstracción simultánea de un hidrógeno y la eliminación de un halógeno. La reacción se lleva a cabo entre el carbono del cloro saturado y el hidrogeno adyacente del carbono vecino.

Estas son las reacciones de mayor importancia en la biodegradación del DDT encontradas en bacterias y eucariontes, en protozoos este proceso no ha sido documentado de manera suficiente por lo que es incierta la vía degradativa de este plaguicida. En algunos protozoos ciliados se ha visto la acumulación de este plaguicida entre una y cuatro horas dependiendo de la especie (Díaz *et al.*, 2006).

En los mamíferos la biodegradación es un proceso más complejo siguiendo la siguiente ruta:

El metabolismo de fase 1 consiste en la introducción de un radical químico mediante reacciones de descloración, reducción, hidroxilación y oxidación, todas ellas en la porción lineal de la molécula. Hasta la fecha, no se han caracterizado todos los sistemas enzimáticos involucrados en las reacciones de biotransformación del DDT, pero se cree que se ven implicadas diversas isoformas de CYP.

Posteriormente, los productos de biotransformación de fase 1 del DDT dan lugar a los metabolitos de fase 2, la cual consiste en la formación de compuestos conjugados con moléculas pequeñas endógenas como la glicina, ácidos biliares, serina o ácido glucorónico los que finalmente son excretados (Prado *et al.*, 2002) (Figura 7).

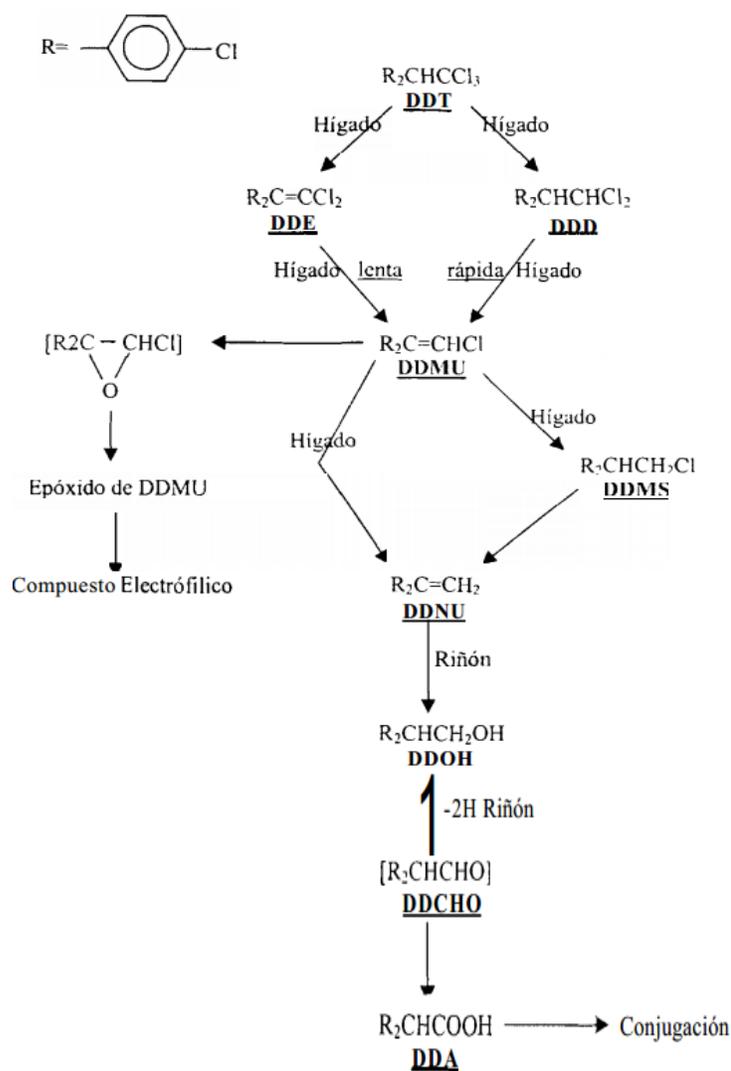


Figura 7 . Biotransformación del DDT en mamíferos (Prado *et al.*, 2002)

2.2.2 Efectos Tóxicos del DDT

Los plaguicidas son cualquier sustancia o mezcla cuyo propósito es evitar, repeler o mitigar cualquier plaga. Todos los plaguicidas poseen un grado inherente de toxicidad para algunos organismos vivos, de otro modo no tendrían uso práctico, lamentablemente la selectividad del DDT no está bien perfeccionada y especies a las cuales no está dirigido suelen quedar afectadas, por que posee sistemas fisiológicos, estructurales o bioquímicos similares a la especie blanco.

Los insecticidas organoclorados suelen causar interferencia con el transporte de iones sodio, potasio, calcio y cloro afectando la estabilidad de la membrana, aunado a la inhibición de actividades enzimáticas selectivas o a la contribución de la liberación y persistencia de transmisores químicos (Curtis, 2006).

El DDT se bioacumula en los tejidos grasos de las personas y los animales, principalmente a través de los alimentos contaminados con el plaguicida. A medida que asciende a lo largo de la cadena trófica, su concentración va en aumento y sus efectos se magnifican.

Mientras que en animales ovíparos afecta principalmente el metabolismo del Ca^{2+} evitando la formación del cascaron del huevo en forma adecuada. Tanto el DDT como el DDE se consideran disruptores hormonales en fauna silvestre y animales de laboratorio.

En mamíferos la exposición aun a niveles sumamente pequeños de estas sustancias durante fases críticas del desarrollo embrionario, fetal y neonatal pueden perturbar el tiempo de gestación, tamaño del producto y predisposición a discapacidades relacionadas con el desarrollo neurológico, problemas crónicos respiratorios e infecciones.

Dependiendo del grado de intoxicación se pueden desarrollar desde problemas neurológicos, trastornos en la síntesis de hormonas esteroideas, transporte de glucosa y vitaminas hasta carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis.

2.2.3 Usos, tiempo de vida media y afinidad del DDT a suelos

Usos. El DDT fue utilizado en México desde 1957 hasta el año 2000 para el control del mosquito *Anopheles* (vector del paludismo) y también en el combate de algunas plagas en productos agrícolas, principalmente del algodón, caña y maíz.

Este insecticida se empleó para fumigar paredes, techos al interior y exterior de las viviendas. La fumigación de una vivienda requería hasta 500 gramos. (Deogracia *et al.*, 2009)

Tiempo de vida media. De acuerdo al tiempo en que tardan en degradarse, los plaguicidas se dividen en grupos. Así, el DDT se identifica como un insecticida de alta persistencia (vida media mayor a 100 días) y por ejemplo, en algunos bosques su vida media llega a ser de 20 a 30 años.

Afinidad por Suelos. La Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) califica la afinidad de las sustancias por el suelo de acuerdo al parámetro Koc (coeficiente de adsorción). En esta calificación las sustancias con un Koc superior a 100 mil son las que se adsorben con mayor fuerza al suelo. El DDT tiene un Koc de 240 mil, el DDD lo tiene de 780 mil y el DDE supera a los tres con un Koc que es cinco veces superior al del DDD. Debido a su alta persistencia y en consecuencia directa de su biodegradación y afinidad por el suelo, es normal que en suelos tratados con el DDT, la concentración de éste vaya disminuyendo al tiempo de que la concentración de los metabolitos va incrementándose, sobre todo el DDE. Se han descrito algunos suelos que son particularmente resistentes a la degradación del DDT y en ellos, el cociente DDE/DDT es menor de lo normal.

En México los estados donde se encuentran las mayores cantidades del compuesto activo son los estados de Veracruz, Tabasco y Campeche correspondiendo al 50%, 25% y 25%, respectivamente; otros estados menormente afectados son: Chiapas, Quintana Roo, Yucatán Oaxaca. (Vázquez *et al.*, 2005)

2.2.4 Monitoreo ambiental del DDT

Es un proceso de evaluación directa de la contaminación del ambiente, realizado mediante la medición cuantitativa del DDT en muestras de alimentos, agua, aire y suelo. Es frecuente que los datos resultantes del monitoreo ambiental se utilicen para estimar de forma indirecta los posibles niveles de contaminación interna de cadenas tróficas.

El monitoreo de plaguicidas en el agua, los alimentos y el aire es fundamental, dado que representan sus principales fuentes de exposición. En la recolección de muestras para monitorización ambiental debe seguirse un protocolo que garantice su calidad para un adecuado procesamiento en el laboratorio.

Dada la multiplicidad de agentes contaminantes y la frecuente carencia de información sobre el uso de plaguicidas en los lugares de estudio, se utilizan métodos de laboratorio llamados multiresiduos, que determinan de forma selectiva y simultánea, concentraciones de compuestos como el DDT y sus metabolitos, con efectividad, reduciendo el tiempo y el costo.

Para lograr mayor precisión en el monitoreo ambiental se combinan dos o más de estas técnicas, mejorando así la sensibilidad y la especificidad. En la tabla III se mencionan algunas de las técnicas instrumentadas usadas en la monitorización del DDT.

Tabla III. Técnicas de análisis multiresiduos utilizadas para el monitoreo de DDT (Ramírez *et al.*, 2011)

Prueba de laboratorio	Tipo de muestra ambiental
Cromatografía de gases	Agua, aire, suelo, alimentos
Cromatografía de líquidos	Suelo
Cromatografía de columnas	Aire
Detección por captura de electrón	Agua, aire, suelo, alimentos
Detección específica de halógenos	Suelo
Detección fotométrica de flama	Suelo, alimentos
Detección de flama ion	Suelo, alimentos
Espectrometría de masas	Agua, suelo, alimentos
Espectrometría de masas de alta resolución	Agua, suelo, alimentos
Ionización química	Alimentos

Los recursos complementarios usados en este tipo de monitorización son la siembra de plantas cultivadas en sistemas cerrados en zonas agrícolas donde se han aplicado plaguicidas, o la colocación de jaulas con peces provenientes de criaderos exentos de estos contaminantes, en ríos, lagos o mares, para analizar la dinámica de estos compuestos químicos y evaluar el nivel de contaminación. Una gran proporción de los plaguicidas se deposita en el suelo y con la acción del agua se filtra alcanzando el fondo de ríos, lagos, mares u océanos, donde habitan estos centinelas biológicos. Para alimentarse filtran el agua de su entorno asimilando en su organismo diversas sustancias, entre ellas plaguicidas, en concentraciones tan elevadas que han permitido considerarles indicadores tempranos de contaminación ambiental (Costa *et al.*, 2007).

2.2.5 Regulación Jurídica Ambiental del DDT

Internacionalmente existen convenios que abarcan elementos fundamentales de la gestión de productos químicos peligrosos o tóxicos desde su producción hasta su eliminación, siendo la regulación más exhaustiva, la de los contaminantes orgánicos persistentes, contemplada principalmente por los siguientes convenios:

- **Convenio de Estocolmo (Suecia 2004):** Los países que integran este convenio adoptan la obligación de prohibir o minimizar el uso de doce sustancias tóxicas incluidas el DDT consideradas causantes de cáncer y de defectos congénitos en personas y animales. El objetivo de este convenio es eliminar o restringir la producción y usos de los contaminantes orgánicos persistentes (COP) que se fabricaban indiscriminadamente, además busca minimizar la generación de los contaminantes producidos de manera no intencional como las dioxinas y furanos.
- **Convenio de Rotterdam (Holanda 2004):** Sobre el Procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo Aplicable a Ciertos Plaguicidas y Productos Químicos Peligrosos Objeto de Comercio Internacional.

El convenio está dirigido a la promoción de la responsabilidad compartida además del esfuerzo conjunto de las partes en el comercio internacional de productos químicos peligrosos. También tiene como objeto facilitar el intercambio de

información acerca de las características de esos químicos mediante un proceso nacional de adopción de decisiones acerca de la importación y exportación.

El convenio otorga a los países importadores la información y herramientas necesarias para identificar daños potenciales y así excluir productos químicos que no logre un manejo seguro. El tratado está basado en un instrumento del PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente) y de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) ya existentes desde 1989. Este instrumento se aplica específicamente a los productos químicos prohibidos o rigurosamente restringidos y a los plaguicidas extremadamente peligrosos como el DDT.

México se encuentra como miembro de estos dos convenios además cuenta con una legislación propia sobre el manejo de los plaguicidas como el DDT.

Normas Nacionales.

- Norma Oficial Mexicana NOM-032-FITO-1995, “Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la realización de estudios de efectividad biológica de plaguicidas agrícolas y su dictamen técnico”.

Esta regulación menciona que para el control de plagas agrícolas se ha requerido del empleo de plaguicidas como una forma de control, lo que ha hecho necesario evaluar la efectividad de los mismos y su inocuidad para los cultivos, a fin de valorar los beneficios de su uso, para que al momento de aplicarlos el productor obtenga los beneficios esperados.

- Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, “Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para su uso agrícola, forestal pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico”.

Dada la naturaleza tóxica de los plaguicidas se debe enfatizar en su manejo, etiquetado y embalaje con el fin de proteger al usuario y al personal ocupacionalmente expuesto. Esa norma se genera con el propósito de fomentar el manejo seguro y comunicar los principales riesgos al momento del uso.

-
- Norma Oficial Mexicana NOM- 003-STPS-1999, “Actividades agrícolas-uso de insumos fitosanitarios o plaguicidas e insumos de nutrición vegetal o fertilizantes- Condiciones de seguridad e higiene”.

La presente norma rige en los centros donde se almacene, trasladen o manejen insumos fitosanitarios o plaguicidas implicados en las actividades agrícolas

- Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-000-SSA1-200X. “Requisitos sanitarios que deben cumplir los servicios urbanos de fumigación, desinfección y control de plagas”.

Esta norma fija los requisitos que deben cumplir los establecimientos que ofrecen el servicio de control de plagas empleando plaguicidas en casa habitación, zonas urbanas y rurales e industria, también las condiciones sanitarias para realizar dicho servicio que coadyuven en la disminución de riesgos asociados a la aplicación de plaguicidas

- Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".

La norma regula el abastecimiento de agua para uso y consumo humano ya que la calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades, para lo cual se requiere establecer límites en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas, químicas y radioactivas. El límite permisible para DDT y sus isómeros bajo esta norma es de 1.00 mg/L.

2.3 Biosensores

Para que una especie funcione como biosensor debe cumplir con determinadas propiedades que logren evidenciar y cuantificar el daño por la presencia de un contaminante, es decir, para que un organismo tenga potencial como biosensor debe cumplir primeramente con características bioindicadoras.

El concepto de organismo indicador se refiere a especies seleccionadas que por su sensibilidad evidenciarán la presencia de algún compuesto dependiendo de sus características estructurales, su funcionamiento y sus reacciones dependen del medio en que se desarrollan y cambian al modificarse las condiciones ambientales. La denominación de una especie como indicadora requiere de conocimiento previo de su interacción comunitaria bajo condiciones normales, incluyendo el ciclo de vida, su estacionalidad, variaciones naturales, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una perturbación ambiental (Raz-Guzman, 2000).

Cuando un organismo cuenta con capacidad bioindicadora reacciona a los cambios ambientales como si fueran estímulos específicos. Los estímulos absorbidos provocan respuesta en los bioindicadores dando información de las perturbaciones ocurridas y en algunos casos nivel de intensidad.

Al incorporar un organismo bioindicador a un sistema analítico que cuantifique el compuesto de interés se puede dar paso a un biosensor.

El término biosensor se aplica a un sistema analítico que acopla un elemento sensible asociado a un sistema de transducción, el cual, permite detectar y medir de manera rápida, proporcional, precisa y sensible la señal producida por la interacción del elemento biológico y la sustancia de estudio.

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta interacción se produce una variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, masa, variaciones de las propiedades ópticas etc.) que detecta el transductor. Ese sistema transforma la respuesta del

elemento de reconocimiento en una señal electrónica a estudio proporcional a su concentración en la muestra (González *et al.*, 2005).

Algunos biosensores han sido desarrollados como métodos analíticos, cuantitativos o semicuantitativos para detectar determinados analitos y más recientemente, para la detección de efectos de contaminación por agentes químicos en el ambiente. Los biosensores ambientales se implementan como métodos de seguimiento capaces de predecir un posible efecto biológico o también como alerta de presencia de algún contaminante (Castro *et al.*, 2007).

2.3.1 Componentes de un biosensor

Un biosensor se compone principalmente de dos partes fundamentales: un elemento biológico llamado bioreceptor y un transductor (Figura 8).

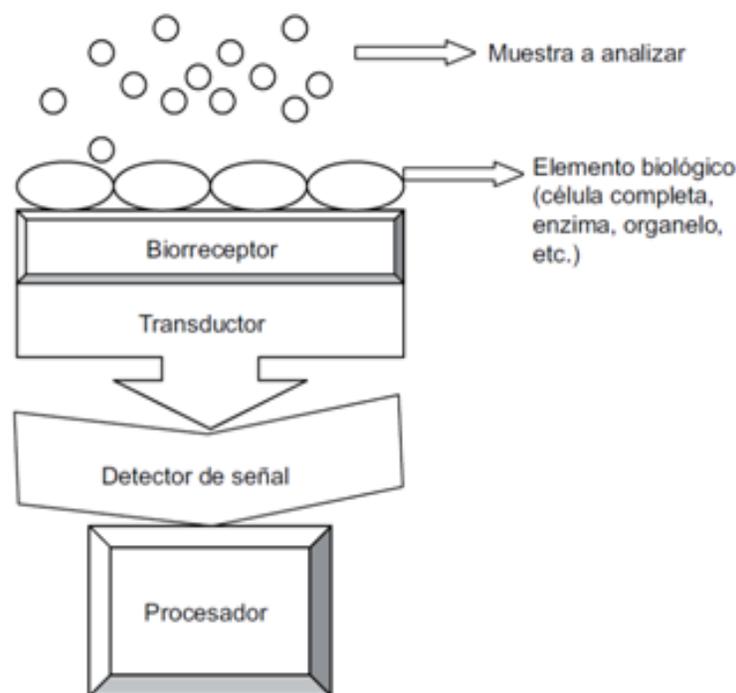


Figura 8. Esquema de un biosensor (Castro *et al.*, 2007)

Los elementos biológicos de reconocimiento pueden dividirse en:

- Enzimas.
- Orgánulo, tejido.
- Célula completa.
- Anticuerpos.
- Ácidos nucleicos.

Según el tipo de interacción que tenga el elemento de reconocimiento o bioreceptor con el analito se puede clasificar en:

- Biocatalíticos: Los que comprenden enzimas aisladas, microorganismos o tejidos que al llevar a cabo reacciones de catálisis con el analito generan un producto detectable y medible, dando origen a los biosensores catalíticos.
- Bioafinidad: Los que incluyen principalmente anticuerpos, ácidos nucleicos los cuales se caracterizan por tener un reacción de reconocimiento y afinidad con el analito produciendo una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor.

La detección de la interacción de puede dar de una forma directa o indirecta.

Los elementos transductores convierten las variaciones de las propiedades físicas o químicas que se producen por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada. La señal generada por el transductor es interpretada directamente y es necesario, la utilización de un software para su procesamiento.

Existen varios tipos de transductores como son:

- Electroquímicos.
- Ópticos.
- Termométricos.
- Nanomecánico.
- Piezoeléctrico.

La elección del transductor está condicionada por el tipo de reconocimiento elegido, ya que determina cuál será la variación en las propiedades que ocurran como consecuencia de la interacción.

2.3.2 Características de un biosensor

Las características con las que debe contar un biosensor ideal son:

- Alta sensibilidad para el análisis de analitos incluso a concentraciones de partes por billón o con capacidad de detectar cantidades inferiores a los límites exigidos.
- Alta selectividad para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares.
- Alta fiabilidad. Los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra y no tengan problemas de ruidos.
- Tiempo de vida largo que no obligue al reemplazo del dispositivo tras un corto periodo desde su fabricación ni a sustituciones frecuentes de componentes del mismo.
- Bajo costo de producción, en general si estos sistemas pueden fabricarse a escala industrial, lo cual abarataría el producto.
- Tiempo de análisis corto que posibilite una actuación rápida de prevención o corrección.
- Manejo sencillo que permita su uso por personal no calificado.
- Capaces de realizar análisis en tiempo real especialmente en el control de procesos, ya que permite controlar parámetros de forma inmediata y automática.
- Portátiles para que sea posible realizar análisis *in situ*.
- Automatizables prescindiendo del control manual para facilitar su integración dentro de los sistemas de monitoreo de los procesos.
- Miniaturizables para hacer el proceso de ensamblaje, transportación y manejo sea más práctico.
- Pocos requerimientos operativos y de almacenamiento que faciliten su empleo y no supongan un costo adicional.
- Con capacidad multi-análisis ciertos biosensores llevan a cabo la determinación de diferentes analitos de forma simultánea.

2.3.3 Biosensores ambientales

En general, los biosensores han adquirido una gran importancia, principalmente en los aspectos médico, alimenticio y lo referente al control ambiental (Castro *et al.*, 2007).

Una de las principales aplicaciones de los biosensores en el área ambiental es la detección de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), el cuál, es un parámetro de gran importancia en el tratamiento de aguas residuales. Con las técnicas convencionales esta prueba requiere de 5 días mientras que con el uso de un biosensor 20 min.

De igual manera, es posible usar biosensores ambientales conectados a sistemas de alarma que emitan una respuesta de alerta cuando exista un exceso de contaminantes, permitiendo tomar acciones rápidas de corrección o prevención (Castro *et al.*, 2007).

Otra aplicación es determinar en suelo y agua la presencia de contaminantes altamente tóxicos como: compuestos orgánicos persistentes, metales pesados, compuestos genotóxicos y disruptores endócrinos (Dawson *et al.*, 2005). A nivel internacional, en Asia y Europa, se han usado biosensores de células completas (bacterias, microalgas e incluso protozoarios ciliados) como elementos biológicos de un biosensor (Costas *et al.*, 2002).

En México la investigación relacionada con el uso de biosensores data de 1983, cuando se reportó el uso del electrodo microbiano para la determinación de DBO por el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

En el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM, se trabaja con biosensores enzimáticos, los que detectan analitos específicos utilizados en el área química analítica y ambiental. La investigación realizada se basa en el empleo de contaminantes específicos o precursores de estos últimos (Castro *et al.*, 2007).

2.3.4 Ejemplos de biosensores

A continuación se presentan algunos biosensores más ampliamente difundidos:

- Las óxidoreductasas son enzimas muy estables que catalizan fenómenos de oxidación o reducción utilizando oxígeno o cofactores. Las enzimas pueden acoplarse a transductores de los tipos potenciométrico, amperométrico, optoeléctrico, calorimétrico o piezoeléctrico.
- Las lectinas son un grupo de proteínas que se unen de manera selectiva y reversible a distintos sacáridos, como los oligosacáridos que se encuentran en las paredes celulares bacterianas. Son moléculas de reconocimiento fácilmente disponibles y económicas que pueden asociarse a distintos transductores como transductores piezoeléctricos o de resonancia de plasmones superficiales.
- Biosensor de glucosa: La enzima glucosa oxidasa es la utilizada, en los biosensores de glucosa, como bioreceptor. Dicha enzima es la encargada de catalizar la reacción



Existen tres tipos de transductores que pueden ser utilizados para medir la concentración de glucosa:

Sensores de oxígeno: Los cuales miden la concentración del mismo convirtiéndola en corriente eléctrica.

Sensores de pH: Miden la producción del ácido glucónico convirtiendo el cambio de pH en una diferencia de potencial.

Sensores de peróxido: Estos miden la concentración de peróxido convirtiendo dicha concentración en una corriente eléctrica.

- Sistema Microtox: Se basa en monitorizar los cambios en las emisiones de luz natural de una bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*, la cual mediante un fluorímetro es cuantificada, disminuyendo al entrar en contacto con el material contaminante. La

prueba es aplicada a muestras de agua. La toxicidad se expresa como concentración efectiva 50 (CE₅₀).

2.4 Microscopía de Fluorescencia

La técnica de microscopía de fluorescencia se usó como sistema transductor mediante la cual se estudió cualitativamente el efecto del DDT sobre el protozoo ciliado.

La microscopía de fluorescencia aprovecha la capacidad de ciertas sustancias de absorber luz de longitudes de onda corta (ultravioleta) y emitir una luz de una longitud de onda mayor (visible).

A diferencia de la fosforescencia que es un fenómeno, en el que ciertos electrones son excitados por una radiación, liberando parte de esta energía en forma de luz, en la cual la sustancia puede seguir emitiendo luz aun horas después de eliminado el estímulo; en la fluorescencia, la liberación de fotones es casi inmediata a su absorción por lo que las sustancias fluorescentes no tienen la capacidad de almacenar energía electromagnética, además de que la excitación y emisión de las sustancias fosforescentes se da a longitudes de onda más altas que en la fluorescencia.

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio óptico, dotado de luz ultravioleta con la que los objetos son iluminados por rayos a una determinada longitud de onda.

La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y emitido una luz con mayor longitud de onda, para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada; se deben colocar filtros apropiados bajo el condensador y encima del objetivo (Figura 9).

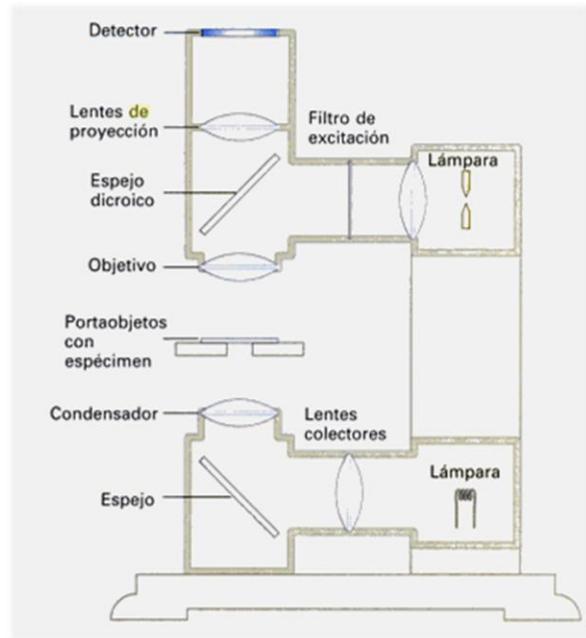
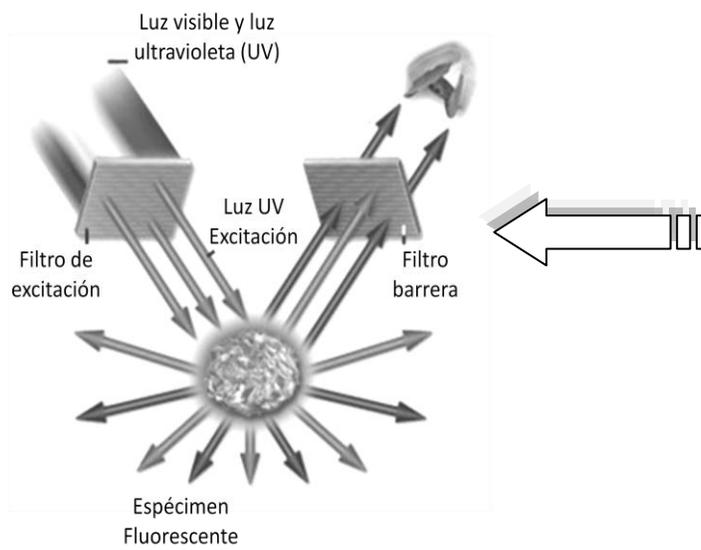


Figura 9. Observación en el microscopio de fluorescencia (Davison M, 2009).

Los filtros juegan un papel muy importante en un microscopio de fluorescencia ya que son los que permiten separar la luz emitida de la luz de excitación. La selección de los filtros apropiados es la clave para que este tipo de microscopía funcione. Básicamente hay tres categorías de filtros:

- Filtros de excitación,
- Filtros de barrera
- Espejos dicróicos, usualmente combinados para producir un cubo de filtros.

Los filtros de excitación permiten que sólo las longitudes de onda seleccionadas de la fuente de luz pasen a través del camino de iluminación del espécimen. Los filtros de barrera o filtros de emisión están diseñados para suprimir o bloquear (absorber) las longitudes de onda de excitación en el paso hacia el detector. Los espejos dicróicos son filtros especializados diseñados para reflejar las longitudes de onda de excitación y dejar pasar las de emisión eficientemente. Los dicróicos se posicionan en el camino óptico después del filtro de excitación pero antes del de emisión, a un ángulo de 45 grados respecto de cada uno de ellos. Las características de cada filtro se pueden ver en su espectro, que muestra el porcentaje de transmisión en función de la longitud de onda.

2.4.1 Fluorocromos (Fura 2-AM)

Los fluorocromos o grupos cromóforos son moléculas aisladas, de estructura covalente e insaturadas, que tienen una absorción característica en la región ultravioleta y una emisión en la región visible. Cuando una serie de compuestos posee el mismo cromóforo, todos ellos absorben aproximadamente a la misma longitud de onda, salvo si existen peculiaridades estructurales perturbadoras como heteroátomos unidos al cromóforo o grupos con insaturaciones conjugadas.

Fura-2 AM es un indicador de alta afinidad a calcio con estructura de acetoximetiléster (AM), útil para la carga intracelular no invasiva de las células.

Cuenta con dobles enlaces conjugados lo que lo vuelve una estructura con propiedad cromófora. En la tabla IV se presentan las propiedades fisicoquímicas más relevantes del Fura 2-AM.

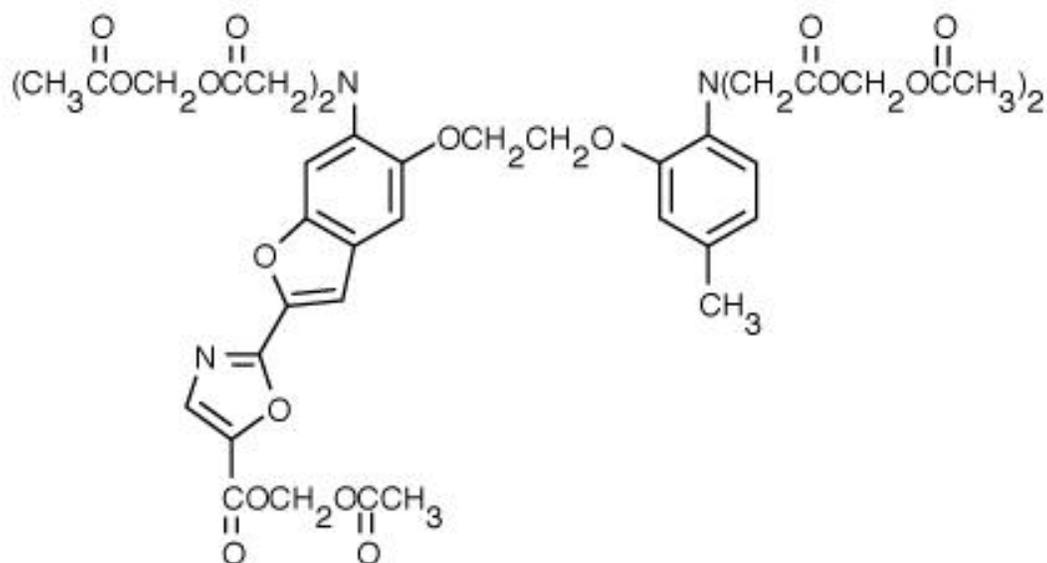


Figura 10. Estructura molecular de FURA 2-AM

Tabla IV. Propiedades fisicoquímicas de Fura 2-AM

Fluorocromo	Fura 2-AM (acetoximetil-éster)
Concentración	1mM en DMSO anhidro
Fórmula molecular	$C_{44}H_{47}N_3O_{24}$
Peso molecular	1001.86
pH de trabajo	7.20 ± 0.50
Longitud de onda de excitación (en DMSO)	340 nm
Longitud de onda de emisión (en DMSO)	510 nm

Compuestos con estructura acetoximetil ésteres (AM): La protección de los grupos carboxílicos como ésteres de AM hace que el colorante tenga una estructura neutra, por lo que puede cruzar la membrana celular. Una vez dentro de la célula, las esterasas se escinden como grupos carboxilo. Este proceso da lugar a los compuestos cargados que están distribuidos dentro de la célula. (Ver figura 11)

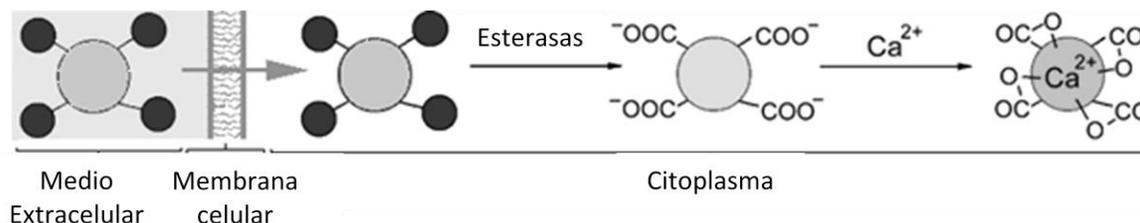


Figura 11. Actividad de los compuestos AM.

La estabilidad completa de los ésteres de AM es muy importante para una quelación completa de los iones calcio. Si la hidrólisis del fluorocromo comienza en medio libre se pueden provocar falsas variaciones en la fluorescencia.

2.4.2 Proceso de quelación del FURA 2-AM

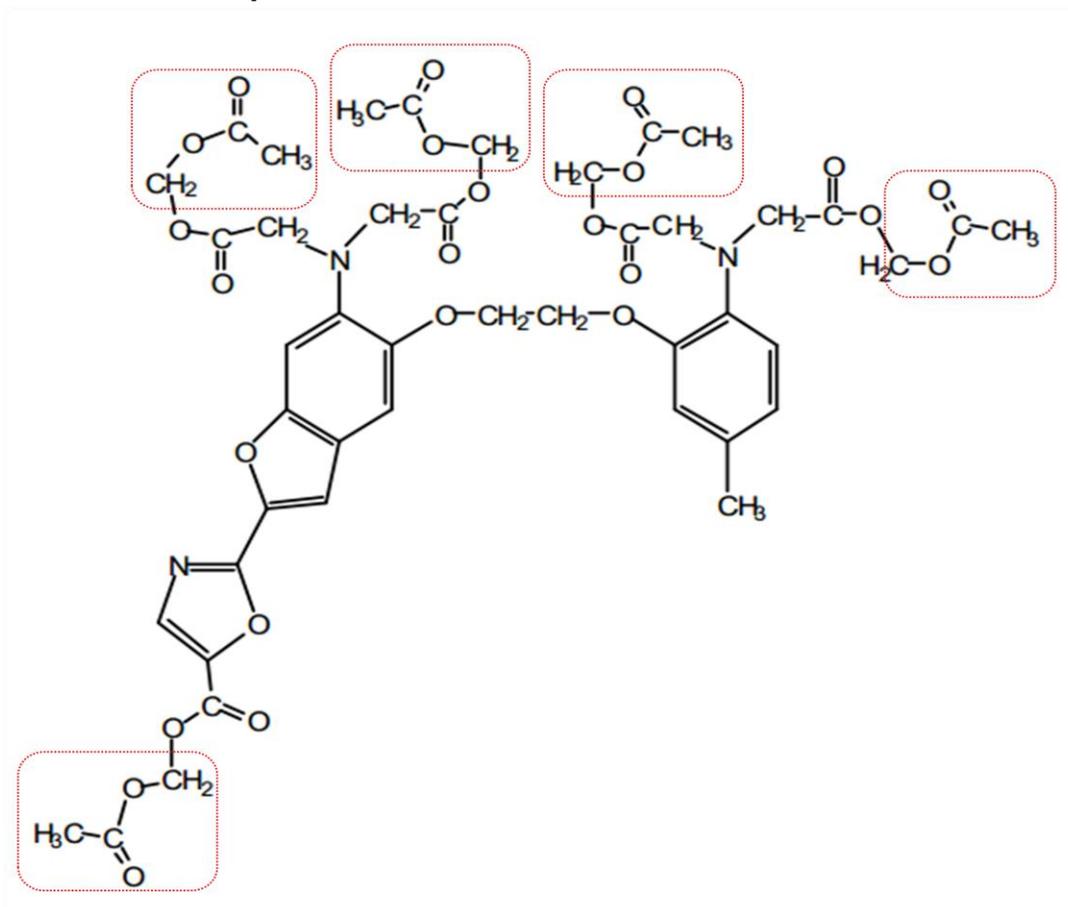


Figura 12. Estructura desarrollada del Fura 2-AM.(Fuente: Sigma-aldrich Catálogo de productos)

El fura 2- AM tiene una estructura compleja compuesta principalmente de grupos ésteres.

Las esterasas presentes en las membranas celulares eliminan selectivamente el grupo acetoximetil terminal de cada cadena (Figura 12), lo que favorece el incremento del número de pares de electrones libres los cuales se coordinan al oxígeno del grupo carbonilo para estabilizar la carga.

Los electrones libres promoverán la formación de ciclos de quelación del calcio, formándose anillos de cinco, seis y siete miembros que son altamente estables. Los anillos de cinco que se forman con el nitrógeno y el oxígeno del grupo carbonilo, se verán mucho más favorecidos que los anillos de cinco y seis formados con los dos oxígenos de los carbonilos, debido a que el nitrógeno es más nucleofílico que el oxígeno.

En la molécula se puede dar hasta la formación de seis anillos quelantes los cuales tienen propiedades cromóforas (Figura 13).

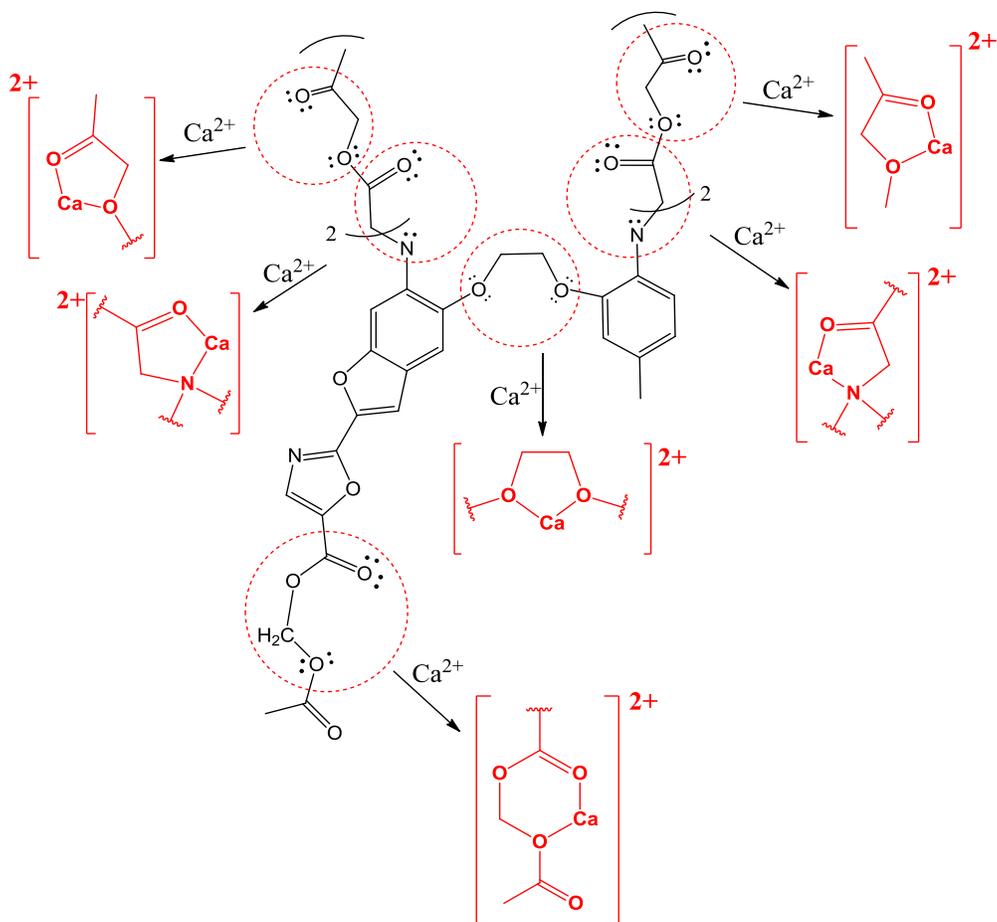


Figura 13. Sitios de quelación del Fura 2-AM.

La ruptura completa de las cadenas por las esterasas se debe dar dentro de las células para dar paso al proceso de quelación con el Ca^{2+} . Si la fase de esterificación no se ha completado, habrá una mezcla de indicador (libre y limitada al calcio) y AM. Cuando las tres formas del indicador son fluorescentes, la señal no sólo depende de los niveles de calcio, sino también de la concentración de indicador no esterificado.

Un inconveniente de los ésteres de AM es que se puede acumular dentro de los compartimentos intracelulares, haciendo indicador insensible a los niveles de calcio citosólico.

La pérdida de estabilidad de los compuestos AM se debe principalmente a reacciones de hidrólisis y fotólisis que rompen las cadenas alifáticas de compuesto (Figura 13) minimizando el número de sitios de quelación del cromóforo disminuyendo su capacidad de atrapar calcio por ende, la formación de los anillos y en consecuencia, su emisión de fluorescencia.

2.4.3 Factores que afectan la fluorescencia

A diferencia de lo que ocurre en otras microscopias (campo claro, confocal) o mediciones (color, cantidad, intensidad de fluorescencia) el procedimiento de tinción por fluorocromos o por autofluorescencia son muy sensibles por la influencia de muchas variables.

- Dispersión de la radiación. La radiación no solo es absorbida o transmitida por la muestra, sino que también es dispersada en todas direcciones. Esta radiación dispersa resultante tiene por lo tanto una energía más baja y una longitud de onda mayor que la radiación incidente. El resultado de ello es una emisión débil que puede interferir en observaciones y mediciones esto se observa en una elevación del ruido de fondo. Esto tiene importancia principalmente cuando se utilizan fluorocromos que tienen longitudes de onda cercana de absorción y de emisión.
- Efecto del filtro interno. La relación entre concentración y fluorescencia se mantiene lineal, siempre que las soluciones utilizadas presenten una absorbancia de la radiación incidente o de excitación $<2\%$. En aquellos casos en que el fluoróforo está a concentraciones muy elevadas podría aparecer ese efecto detectándose una menor fluorescencia que la correspondiente al mismo fluoróforo en una solución más diluida. Este efecto paradójico es debido a la pérdida de potencia radiante de la radiación de excitación cuando esta recorre el camino óptico, ya que el fluoróforo a su vez, absorbería la radiación de excitación. Puesto que la intensidad de la emisión depende de la intensidad de radiación de excitación, si esta última disminuye por efecto del filtro interno también disminuirá la fluorescencia observada o detectada.
- Naturaleza del disolvente: La fluorescencia de una molécula disminuye en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con dichos átomos en su estructura.

-
- pH: La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende del pH. Es probable que tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión sean diferentes en las formas protonadas y las no protonadas.
 - Temperatura: Las variaciones de temperatura afectan la viscosidad del medio y por lo tanto el número de colisiones de las moléculas fluorescentes. En general un aumento en la temperatura disminuye la eficiencia, aumentando el número de colisiones moleculares y facilitando la desactivación de las moléculas por procesos diferentes a la fluorescencia
 - Presencia de impurezas o iones: Aniones como I^- , Br^- y Cl^- tienen un efecto de atenuación de la fluorescencia de ciertos compuestos. Algunas impurezas pueden observar la radiación de excitación o la de emisión y ser capaces de producir fluorescencia.
 - Fotodescomposición: Este se vuelve un problema a disoluciones muy diluidas. En muchos casos la potencia de radiación puede ser suficiente para provocar la descomposición del fluorocromo. La mayoría de los productos de la descomposición no son fluorescentes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar cualitativa y cuantitativamente la respuesta de *Colpoda cucullus* a exposiciones controladas de DDT, para determinar si este microorganismo tiene aplicación en la conformación de un biosensor ambiental.

3.2 Objetivos Particulares

- * Conocer el comportamiento biológico de *Colpoda cucullus* y cotejar si cumple con las características morfo-fisiológicas monitoreables que evidencien el daño por la exposición controlada al plaguicida DDT.
- * Determinar parámetros toxicológicos como CL₉₀, CL₅₀, CL₁₀, NOEL y NOEC (útiles en la conformación del biosensor).
- * Realizar la comparación toxicológica (CL₅₀) entre la cepa de referencia y la cepa silvestre para emplear la más sensible en experimentos de cuantificación del contaminante.
- * Verificar que el mecanismo de cuantificación (fluorocromo-catión Ca²⁺) de la respuesta de *Colpoda cucullus* es indicativo del daño a la membrana provocado por la cantidad de DDT al que se vio expuesto.

3.3 Hipótesis

El DDT al ser un plaguicida altamente tóxico, alterará significativamente las características morfo-fisiológicas del microorganismo ciliado relacionadas con la fosforilación oxidativa y la permeabilidad de la membrana; causadas por un bloqueo en los canales iónicos dependientes de voltaje, disminuyendo el Na^+ , K^+ y principalmente, el Ca^{2+} intracelular previamente quelado con un fluorocromo específico y en consecuencia, se observará una disminución de la fluorescencia emitida.

3.4 Justificación

Debido a que el DDT es un compuesto muy estable y persistente en el ambiente, de fácil dispersión, bioacumulación y biomagnificación, es importante contar con un microorganismo cosmopolita cuyas características (tiempo de duplicación, CL_{50} , intensidad relativa) reflejen cuantitativamente el daño causado por el grado de contaminación presente en un objeto de estudio (muestras de concentración conocida, muestras ambientales etc.), para poder iniciar un proceso de biorremediación evitando así, su paso a cadenas tróficas y daño a organismos superiores.

Por lo anterior, este trabajo propone el uso innovador de *Colpoda cucullus* y su respuesta cuantificable a concentraciones conocidas del plaguicida como un sistema ajustable al diseño integral de un biosensor aplicable en muestras de agua bajo condiciones de laboratorio.

3.5 Alcances del Trabajo

El presente trabajo pretende fijar algunos criterios para el diseño de un biosensor (a nivel laboratorio) basado en la respuesta toxicológica del elemento biológico al contaminante.

Permitiendo conocer los puntos críticos de la técnica desde el mantenimiento del protozoo, bioensayos, tinciones fluorescentes hasta la obtención de resultados cuantitativos (intensidad relativa) para que en proyectos futuros se dé la optimización del procedimiento que logre cuantificar confiable, sensible y selectivamente DDT en muestras ambientales.

3.6 Desarrollo general y estrategia de trabajo.

El desarrollo experimental del presente trabajo se dividió en dos etapas para su óptima ejecución ya que la realización de la parte 2 dependía rigurosamente de los resultados de la parte 1:

- * Ensayos para determinar el efecto toxicológico del DDT

Los quistes a partir de los cuales se exquistaron células tróficas fueron obtenidos por un trabajo de aislamiento previo (Castro, 2004.) y mantenidos en condiciones de esterilidad, obscuridad y 28°C contenidos en una matriz de algodón.

Las células se cultivaron en diferentes medios con el fin de conservarlas en las mejores condiciones para no acarrear problemas de mantenimiento a lo largo de la experimentación.

Los bioensayos de toxicidad se realizaron de igual manera para la cepa silvestre y la de referencia. Según la concentración letal 50 se seleccionó la cepa más sensible con el propósito de obtener resultados cuantificables a menores cantidades de DDT.

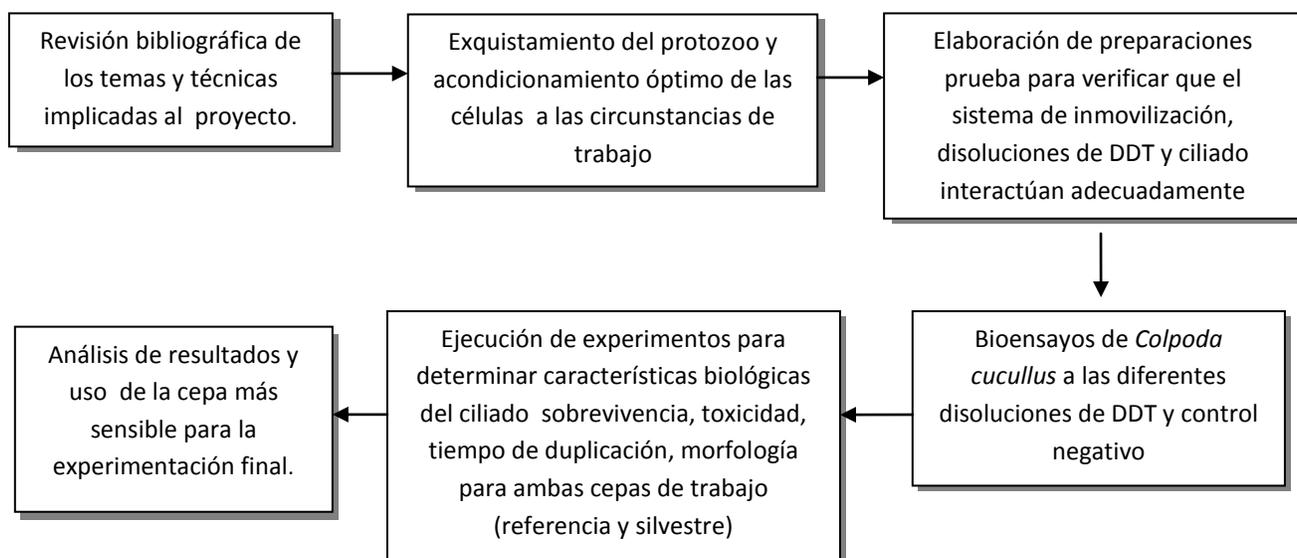
- * Ensayos con Fura 2-AM y DDT.

En esta parte del trabajo se observó la respuesta del Ca^{2+} (mediante uso el Fura 2-AM) antes y después de la exposición al contaminante, la cual, se cuantificó en forma de bioluminiscencia o intensidad de fluorescencia mediante un software de análisis de imagen. Esto pretendió ser una vía alterna de cuantificación ya que se han probado

otros métodos como introducción de micro electrodos en célula para monitorear el cambio de potencial en la membrana (Castro, 2012).

Mediante el parámetro de bioluminiscencia se pudo medir el daño provocado por el xenobiótico, fijando así, una curva patrón en la cual se interpolaron muestras de referencia para determinar si existe una diferencia significativa entre concentración obtenida por la respuesta del protozoo y la concentración de la dilución prueba.

Parte 1



Parte 2

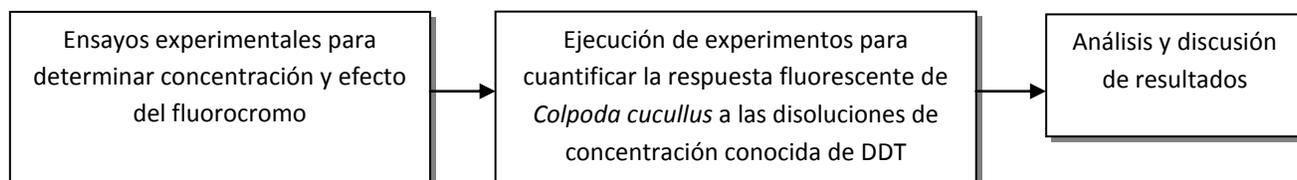


Figura 14. Esquema general del trabajo experimental.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARTE 1.

Efectos toxicológicos del DDT en *Colpoda cucullus* (cepa silvestre y de referencia).

4.1 Obtención de las células tróficas de *C. cucullus*

El exquistamiento de *Colpoda cucullus* se indujo con la adición de agua corriente a cajas de Petri que contenían quistes del protozoo.

Se prepararon cuatro infusiones de mantenimiento: cebada-trigo, arroz, chícharo, lechuga con 100 mL agua corriente + 100mg de semillas u hojas llevadas a ebullición por dos minutos; las infusiones se enriquecían con 100 μ L de una suspensión de *E.coli* (1×10^6 UFC/mL).

Posteriormente se inocularon 20 trofozoitos en 5 mL de la infusión y se incubaron durante 24 hrs a 28°C con seis horas de aireación y luz diaria.

El medio de mantenimiento ideal se seleccionó según el tamaño, el número de células obtenidas después de la incubación, adaptación del protozoo a la suspensión y turbidez del medio.

Habiendo seleccionado el medio ideal se sembraban las células diariamente bajo las condiciones antes descritas y se estudiaban en el microscopio estereoscópico Motic SMZ-168 a 3, 4 y 5X.

4.2 Solubilidad del DDT

Debido a la naturaleza hidrofóbica del DDT se eligieron tres disolventes orgánicos para solubilizar el plaguicida, seleccionando en base a la tolerancia del protozoo al disolvente y su capacidad de solubilidad.

Para los bioensayos por cada disolvente se prepararon siete diluciones (disolvente orgánico: agua corriente) (Tabla V) cada una se puso en contacto con 10 protozoos durante 30 minutos cuantificando células muertas según la lisis o inmovilidad celular. Estas pruebas se realizaron

por triplicado usando agua corriente como blanco. Con base en los resultados se calculó la CL₅₀ por disolvente mediante un análisis PROBIT. En la tabla V se muestran las diluciones empleadas para el cálculo de las CL₅₀ de los disolventes orgánicos a prueba.

Tabla V. Diluciones de los diferentes disolventes empleados en la determinación de la CL₅₀.

Disolvente	Diluciones (mg/mL)						
CH₃(CO)CH₃ (Acetona) (Pureza 99.8%. J.T.Baker)	55	50	47.5	45	42.5	40	35
CH₃OH (Metanol) (Pureza 99.9% J.T. Baker)	80	70	60	50	40	30	20
(CH₃)₂NCHO (Dimetilformamida) (Pureza 99%. Sigma Aldrich)	60	50	40	30	20	10	5

Se realizó complementariamente una prueba de solubilidad pesando 10 mg de DDT y añadiendo volúmenes de 100 µL de disolvente seguidos de una agitación vigorosa por 30 minutos. Esta adición de volúmenes fue continua hasta la desaparición total de los cristales de DDT.

4.3 Preparación de stocks y diluciones de DDT

Para la realización de las diluciones se partió de diferentes stocks (DDT: Acetona) a una concentración de 40, 20, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.5 mg/mL esto con el fin de emplear la mínima cantidad de acetona necesaria para mantener soluble y biodisponible el DDT en los experimentos.

Por lo anterior, las diluciones se prepararon con la alícuota de stock necesaria llevando a un volumen final con 5 mL de agua corriente.

Las diluciones se prepararon para cada uno de los ensayos y se emplearon dentro de la primera hora ya que no son estables por periodos prolongados de tiempo (24 horas).

NOTA: la cantidad de acetona presente en las diluciones no excedió en ningún ensayo más de 35 mg/mL esto acorde a la última dilución de la CL₅₀ de acetona en la cual no se observó daño aparente en los protozoos.

4.4 Bioensayos de toxicidad *C. cucullus* – DDT

En este experimento se prepararon siete diluciones de DDT a 4, 3, 2, 1.50, 1, 0.50 y 0.25 mg/mL. Haciendo uso de la técnica de micropipeteo se seleccionaron y se expusieron 20 trofozoitos de *C. cucullus* a 60 µL de la dilución prueba en un portaobjetos excavado por un tiempo de 30 minutos; pasado el tiempo del ensayo las células se recuperaron para realizar una tinción con azul de tripano al 0.25% para evidenciar el daño en la membrana celular de los protozoos. Considerando a las células teñidas y/o lisadas como células muertas.

Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las diluciones, monitoreándose cada 5 minutos bajo un microscopio estereoscópico a 4x. Como blanco se tomaron 60 células en agua corriente por dilución.

Mediante un análisis PROBIT se calculó la CL₅₀, CL₁₀, CL₉₀, UT y con un análisis de varianza ($\alpha=0.05$) la NOEC y LOEC del DDT para *C. cucullus*.

4.5 Determinación de cambios morfológicos sufridos durante la exposición al DDT

Para observar el daño morfológico en el protozoo por la exposición prolongada al contaminante, se seleccionaron 30 células al azar de una resiembra de 24 horas usadas como blanco para esta prueba, las cuales se inmovilizaron en metilcelulosa al 2%.

Las células se observaron bajo un microscopio óptico (Iroscope MG-11T) con una cámara fotográfica acoplada (Cámara CCD SYSCOM). Posteriormente se tomó una fotografía y

sobre ésta se midieron el ancho y largo del protozoo haciendo uso de un software (Motic Images 2.0).

En el caso de las células expuestas, se tomaron 10 protozoos e individualmente, se expusieron a una dilución de DDT de 0.065 mg/mL en una caja de Petri de un 1 cm de diámetro por un tiempo de 20 horas siguiendo las condiciones de incubación antes mencionadas. Posteriormente se tomaron tres células por caja y se prosiguió con su inmovilización y medición.

Estas pruebas se aplicaron de igual manera para la cepa silvestre y para la cepa de referencia.

4.6 Ensayos para establecer el efecto del DDT en el tiempo de duplicación de *C. cucullus*

Otro aspecto toxicológico que se consideró fue la afectación en el tiempo de duplicación del protozoo siguiéndose el siguiente protocolo.

En una caja de Petri de 1 cm de diámetro se colocó un espécimen de *C. cucullus* poniéndose en contacto con 1 mL de una disolución de 0.065 mg/mL de DDT. Se realizaron tres corridas con 10 organismos por prueba. El blanco para el ensayo siguió el mismo procedimiento y fue con agua corriente. El tiempo de exposición fue de 20 horas y posteriormente, se contaron las células al final de la prueba mediante un microscopio estereoscópico.

Por otro lado, las determinaciones con la cepa ATTC®30916 se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento sumándose las concentraciones de 0.031 y 0.015 mg/mL. Notándose que a concentraciones mayores de 0.065 mg/mL los trofozoitos no sobrevivían el tiempo de exposición.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARTE 1.

Efectos toxicológicos del DDT en *Colpoda cucullus* (cepa silvestre y de referencia).

5.1 Desarrollo de *C. cucullus*

El medio de mantenimiento fijado como ideal fue el de cebada-trigo enriquecido con *E.coli* ya que se observó un abundante y constante desarrollo del protozoo, además que se obtenía un sobrenadante más limpio lo que facilitaba la observación al microscopio y las resiembras del ciliado (Tabla VI).

Tabla VI. Desarrollo de *C. cucullus* en las diferentes infusiones de trabajo y su limpieza (cantidad de materia orgánica disuelta)

Desarrollo de <i>C. cucullus</i>.			
Infusión cebada-trigo	Infusión de arroz	Infusión chícharo	Medio lechuga
+++++	+++++	+++	++
Limpieza de la infusión de mantenimiento			
Infusión cebada-trigo	Infusión de arroz	Infusión chícharo	Medio lechuga
****	**	***	*****

Esto se debe a que las semillas de cebada y trigo al someterlas a un calentamiento en agua liberan una mayor cantidad de materia orgánica, principalmente almidón así como proteínas compuestas principalmente por aminoácidos de lisina, vitaminas como el inositol y oligoelementos como hierro, zinc, cromo, selenio yodo; los cuales son fácilmente tomados por los colpódidos.

Así mismo estos nutrientes fomentan la proliferación de bacterias y dado que este tipo de eucariontes se alimentan de microorganismos más pequeños, siendo especialmente depredadores de bacterias gram negativas (*Enterobacter aerogenes* y *E.coli*), la suspensión resultó óptima para el sostén del protozoo.

Además las resiembras diarias, las condiciones de baja luminosidad (fotoperiodo: 6 horas), la temperatura (28°C) y la humedad (agua corriente) conservaron el ciclo vital del cultivo.

Se indujo la formación de quistes mediante una desecación progresiva de células tróficas en algodón estéril esto con el fin de conservar la cepa.

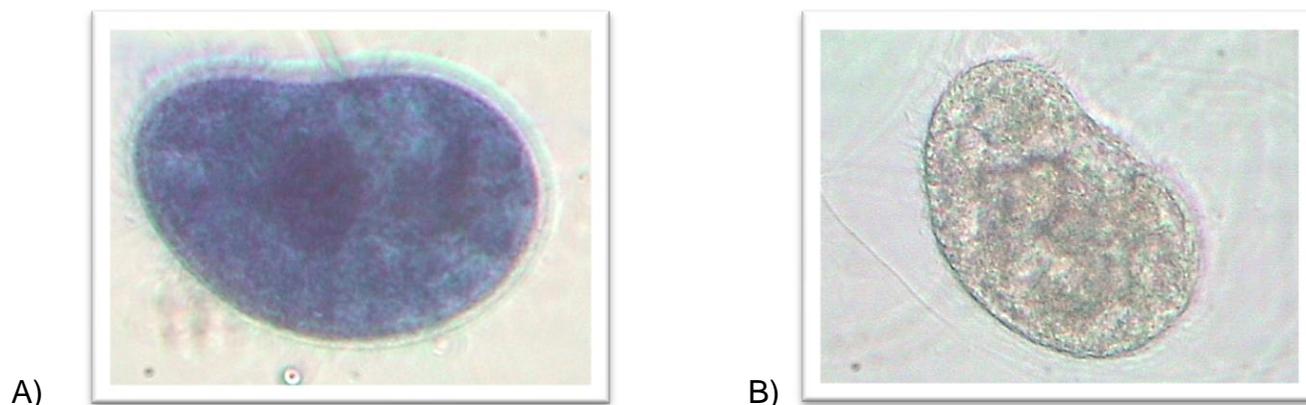


Figura 15. Células tróficas de *C. cucullus*. B) Microscopía de campo claro. Observación a 40x. A) Tinción con azul de metileno al 0.20%. Campo claro. Observación a 40x

5.2 Selección del disolvente recomendable para la solubilizar el DDT

Para la selección del disolvente orgánico se realizaron pruebas de solubilidad así como bioensayos con cada uno de ellos para calcular la CL₅₀. (Tabla VII).

Tabla VII. Solubilidad y CL₅₀ de los diferentes disolventes para *C. cucullus* (cepa silvestre)

Disolvente	CL ₅₀ mg/mL	mL necesarios para solubilizar 0.01g de DDT
Dimetilformamida	25.85	0.250
Acetona	45.20	0.150
Metanol	51.71	1.500

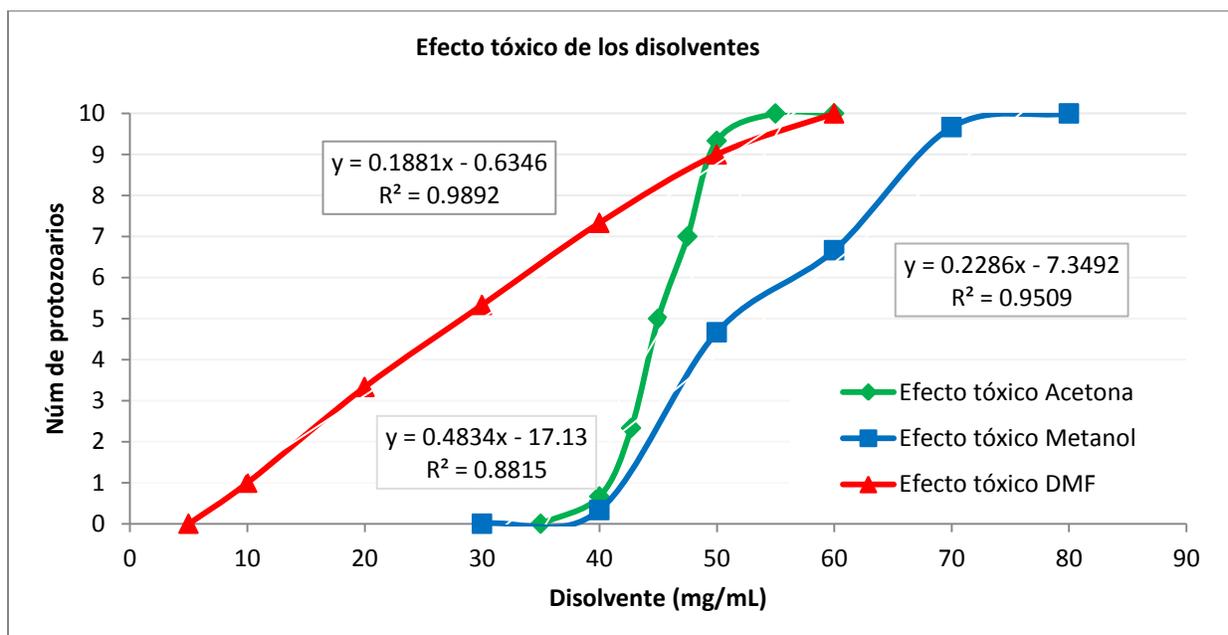
La polaridad es la propiedad de una molécula que representa la separación de las cargas eléctricas dentro de sí misma y se basa en la relación de su constante dieléctrica (ϵ_r) y su

momento dipolar; el aumento de estas dos propiedades es proporcional al índice de polaridad (I_p) de una sustancia.

El DDT al ser un compuesto apolar se solubilizó con un mínimo volumen del disolvente menos polar que es la acetona (I_p : 5.4), en consecuencia, al ascender la polaridad del disolvente, aumenta la cantidad de disolvente necesaria para solubilizar el plaguicida, como el caso de la dimetilformamida (I_p : 6.4) y el metanol. (I_p : 6.6) (Tabla VII) siendo este último del cual se necesitó un mayor volumen al ser un líquido más polar.

El agua al tener un índice de polaridad de 9 hace que el DDT sea prácticamente insoluble en este disolvente y se haya tenido la necesidad de solubilizarlo en otro disolvente orgánico.

Otros disolventes con capacidad de solubilizar idealmente el DDT son hexano, benceno, éter y cloroformo, los cuales se descartaron por su costo, alta toxicidad e inflamabilidad.



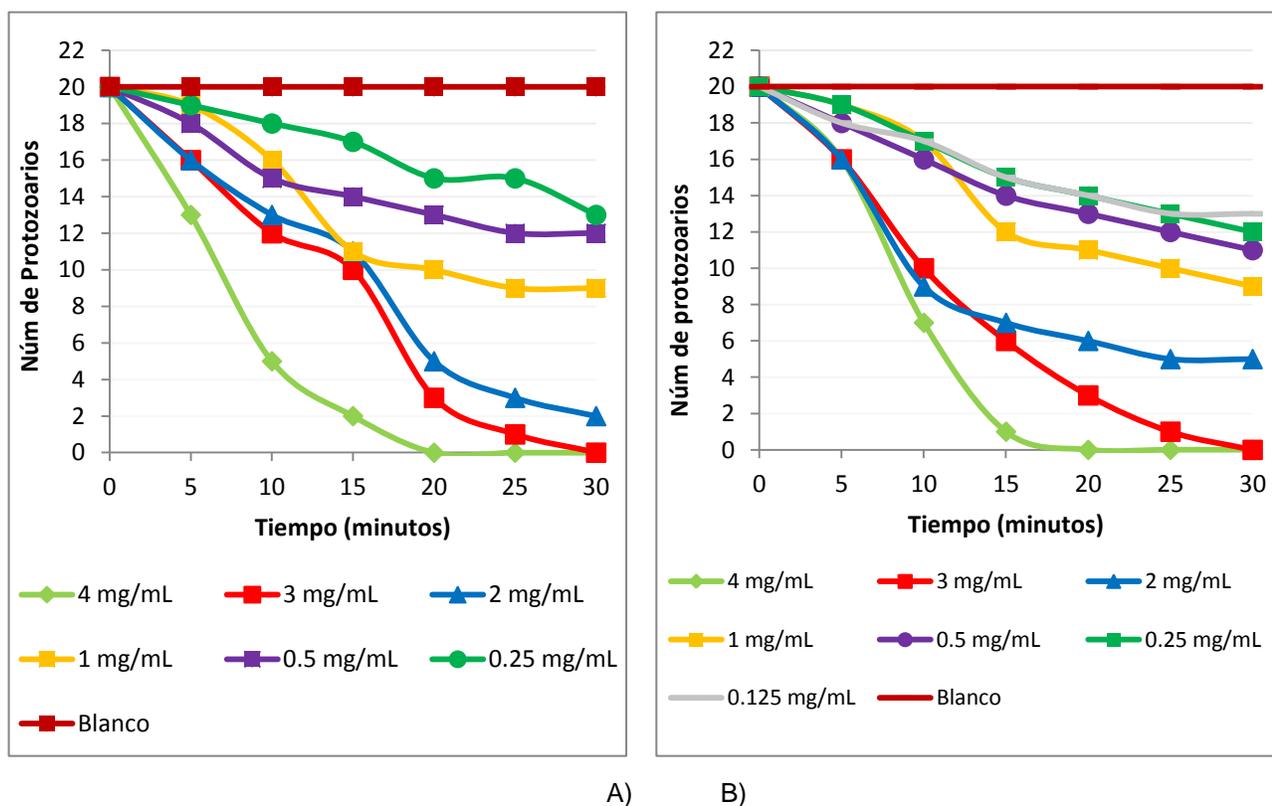
Gráfica 1. Comportamiento de los bioensayos de los diferentes disolventes en la cepa silvestre

Según las CL_{50} calculadas, el disolvente más tóxico para el protozoo fue la DMF seguida de la acetona y el metanol (Gráfica 1).

Aunque el metanol resulto ser el disolvente más inocuo a las células se descarto su uso por su alta polaridad y baja capacidad de solubilizar el DDT lo que implicaría el uso de mayores cantidades de disolvente en los bioensayos influyendo en el resultado final, por lo tanto, el disolvente ideal para volver biodisponible el contaminante fue la acetona además de que resulta ser un compuesto disolvente tóxico al ambiente, económico y accesible.

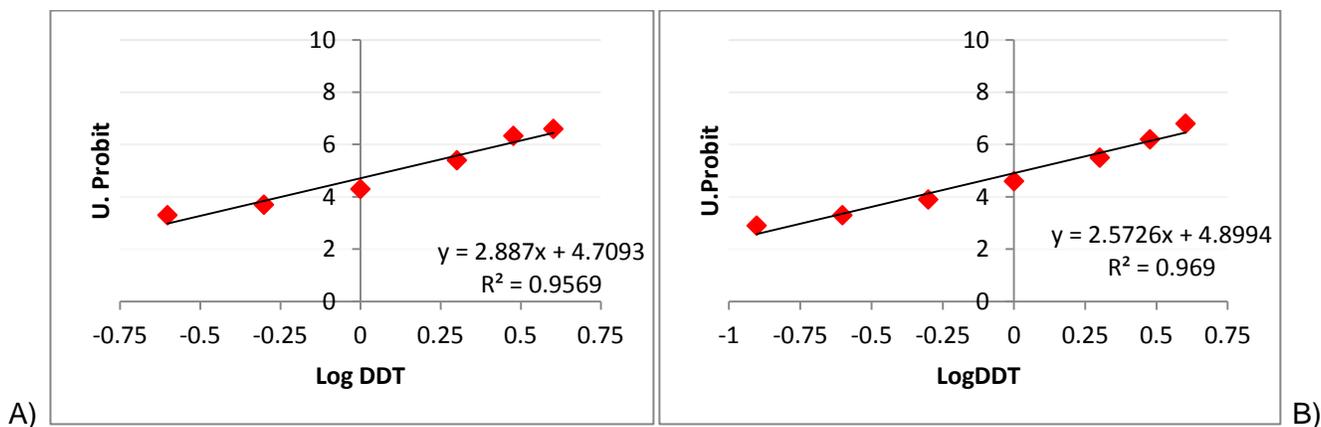
5.3 Obtención de la CL₅₀ para DDT

Después de monitorear la exposición a corto plazo del microorganismo al DDT, se observó que para ambas cepas la muerte comienza dentro de los 10 minutos (Gráfica 2) presentándose la lisis directa en concentraciones mayores a 2 mg/mL; a menores cantidades de contaminante el microorganismo presenta principalmente inmovilización ciliar y malformación en su membrana.



Gráfica 2. Efecto letal del DDT en *C. cucullus* A) cepa silvestre B) cepa ATTC®30916

Con los datos anteriores se realizó el cálculo del porcentaje de respuesta y posteriormente su transformación a unidades PROBIT con ajuste para realizar el desarrollo estadístico de la concentración letal noventa, media y diez (Gráfica 3).



Gráfica 3. Obtención de la CL₅₀, CL₁₀ y CL₉₀ por *C. cucullus* A) Cepa silvestre B) cepa ATCC®30916

Tabla VIII. Efecto tóxico cuantitativo del DDT sobre *C. cucullus*.

	Cepa silvestre	Cepa ATCC®30916.
CL₅₀	1.81 mg/mL	1.10 mg/mL
CL₉₀	3.41 mg/mL	2.58 mg/mL
CL₁₀	0.29 mg/mL	0.21 mg/mL
NOEC	0.25 mg/mL	0.18 mg/mL
LOEL	0.40 mg/mL	0.22 mg/mL
UT	0.55	0.91

Se realizó el análisis comparativo de varianza ($\alpha=0.5$) de los resultados obtenidos (CL₅₀, CL₁₀, CL₉₀) y se encontró diferencia significativa de respuesta al xenobiótico, fijando a los microorganismos provenientes del cultivo ATCC (referencia) como más sensibles al contaminante, esto se puede atribuir a que al ser una cepa mantenida en condiciones específicas de laboratorio no cuenta con alguna tolerancia al plaguicida u otros contaminantes.

Para demostrar la posible tolerancia o resistencia de la cepa silvestre al DDT se debería realizar un estudio epigenómico comparativo (estudio de zonas metiladas del DNA,

modificación de histonas y microarreglos para encontrar el número de repeticiones de genes implicados en el metabolismo del DDT) entre la cepa silvestre, la ATCC y una de referencia con el fin de encontrar la diferencia genética que hace que la cepa silvestre sobreviva y se adapte a mayores cantidades de contaminante.

Ya que la UT se encuentra en valor muy cercano a 1 el DDT se puede considerar como un compuesto súper tóxico (Castillo, 2004). La concentración más alta a la que no se observa efecto desfavorable en las células (NOEC) se calculó en 0.25 y 0.18 mg/mL para la cepa silvestre y para la cepa ATCC respectivamente; en el caso de la concentración más baja a la que se observa un efecto dañino (LOEC) se encontró en 0.40 y 0.22 mg/mL, respectivamente. En la tabla VIII se presentan los resultados que permiten conocer el daño aparente que provoca el contaminante sobre el objeto experimental, dando base a estudios más detallados de toxicidad.

5.4 Cambios morfológicos sufridos durante la exposición al DDT

Para ambas cepas el tiempo de exposición de las células prueba fue de 20 horas a una concentración de DDT de 0.065 mg/mL.

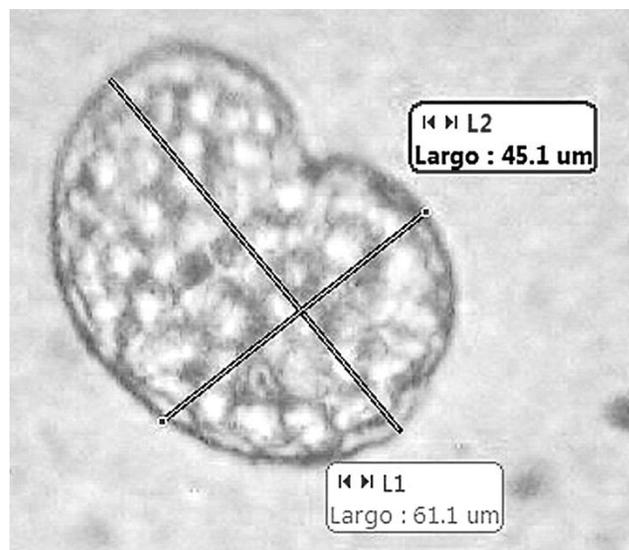


Figura 16. Medición del protozoo. Campo claro a 40x.

Al realizar la medición de las dimensiones del protozoo silvestre su tamaño se encuentra entre $61.93 \pm 1.57 \times 44.5 \pm 2.78 \mu\text{m}$ con una heterogeneidad de población del 10%.

Después de la exposición al DDT el tamaño de las nuevas células se ve significativamente alterado dando como resultado individuos cuyo tamaño oscila entre $65.55 \pm 5.48 \times 47.2 \pm 8.03 \mu\text{m}$ con una dispersión en las medidas de un 28.5%. Para la cepa ATTC®30916 bajo la misma metodología el tamaño normal oscila en $58.35 \pm 0.80 \times 42.51 \pm 1.83 \mu\text{m}$; con una heterogeneidad del 8.5%, después de la exposición de las células al contaminante su tamaño fue de $65.43 \pm 1.82 \times 49.85 \pm 3.07 \mu\text{m}$ con una variación del 13%.

Los datos se compararon mediante un análisis de varianza encontrando una diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) entre los valores del blanco y los valores resultantes de la intoxicación.

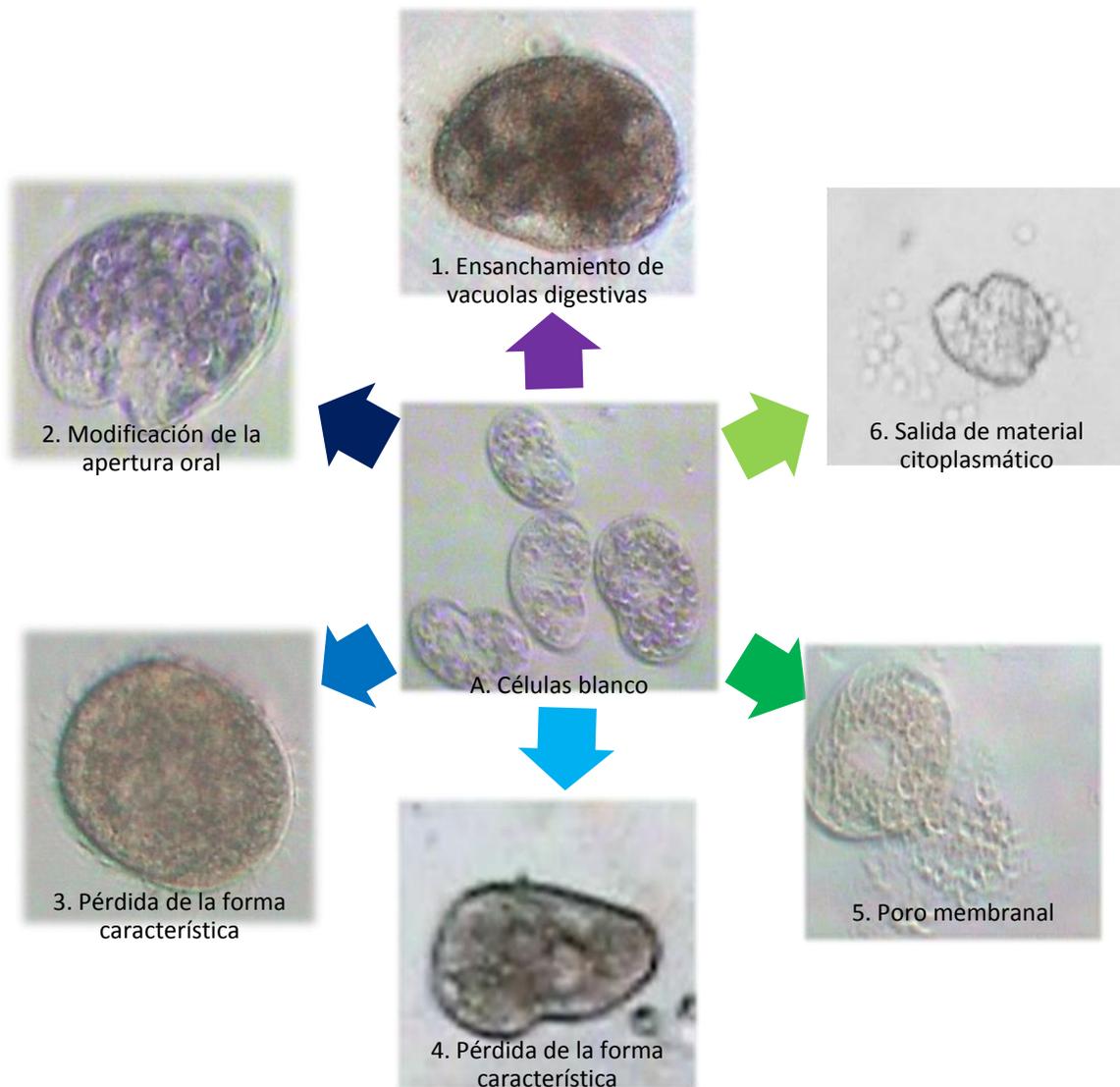


Figura 17. Modificaciones morfológicas sufridas por el protozoo ante la exposición al DDT. Campo claro 40X

Algunas modificaciones observadas a lo largo de los bioensayos son las presentadas en la figura 17. En donde se observan células crecidas en un medio sin DDT las cuales, no sufrieron perturbación por el contaminante (A) conservando la estructura característica del protozoo de forma arriñonada y componentes citoplasmáticos normales.

Para las imágenes 1-4 la forma característica del organismo se ha perdido (3) las vacuolas contráctiles y digestivas son de un mayor tamaño (1, 4) provocado por que las vacuolas contráctiles intentan contrarrestar el efecto osmótico dañino del DDT y por la fagocitosis del contaminante buscando disminuir la cantidad del plaguicida presente y así el efecto tóxico sobre el individuo, aunado a la modificación del citostoma y el vestíbulo alimenticio (2, 6).

En el caso de la imagen 5 se observó la ruptura de la membrana del protozoo lo que permite la liberación del material citoplasmático (6) y por ende la lisis observada principalmente en la exposición del microorganismo a altas concentraciones del compuesto organoclorado.

El daño existente en la membrana originado por la inhibición del transporte de sodio, calcio, potasio, provocó la disociación de los microfilamentos formados por actina, actínina y fodrina, proteínas que colaboran en el anclaje del filamento a la membrana, por lo tanto, hay una anomalía en la formación o mantenimiento de la membrana y predisposición a su ruptura.

5.5 Efecto del DDT en el tiempo de duplicación de *C. cucullus*

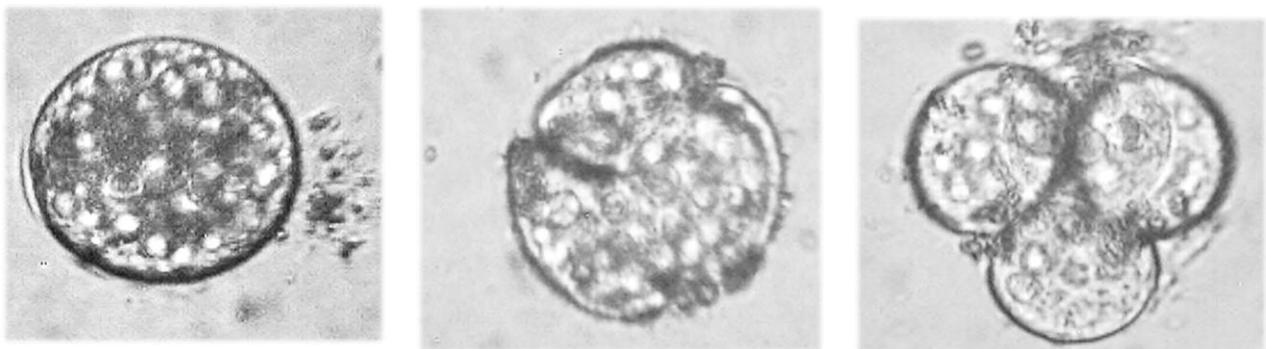


Figura 18. Proceso de división de *C. cucullus*. Campo claro 40x.

El tiempo de duplicación en condiciones de laboratorio para *Colpoda cucullus* (cepa silvestre) fue de 6.56 ± 0.05 hrs dato acorde con lo citado en la literatura. (Müller, 1970). Durante la exposición del protozoo al DDT a una dilución de 0.065 mg/mL el tiempo de duplicación se vio aumentado 2.4 veces dando como valor numérico 15.55 ± 3.02 hrs.

Para las pruebas con la cepa ATTC®30916 se llevó a cabo el mismo procedimiento sumándose las concentraciones de 0.031 y 0.015 mg/mL. Notándose que a concentraciones mayores de 0.065 mg/mL los organismos incubados no sobrevivían el tiempo de experimento y a 0.15 mg/mL, el resultado de duplicación no se afectó estadísticamente respecto al control (ANOVA $\alpha = 0.05$) Ver Tabla IX.

Tabla IX. Influencia del DDT en el tiempo de duplicación de *C. cucullus*

	Blanco	0.065 mg/mL	0.031mg/mL	0.015 mg/mL
Tiempo de Duplicación (hrs)	6.30 ± 3.02	14.10 ± 3.02	10.51 ± 3.02	6.41 ± 3.02

El aumento significativo en el tiempo de duplicación se atribuye a que el DDT inhibe la actividad de la ATP sintasa, enzima clave de la fosforilación oxidativa, evitando la síntesis del ATP por diferentes vías. Inhibición de la ATP sintasa, interrupción del aporte de ADP, y privación de la fuerza impulsora de la ATP sintasa, es decir, la entrada incontrolada de protones hacia la matriz celular.

En las mitocondrias la deficiencia de ATP puede causar un aumento en la permeabilidad interna de las mismas, o la creación de poros proteicos. Estos poros permiten el flujo libre de protones hacia la matriz, lo cual hace desaparecer de manera rápida y completa el potencial de membrana, detiene la síntesis de ATP y permite la entrada osmótica de agua, de modo que las mitocondrias se hinchan. El calcio que se acumulo en la matriz sale a través del poro, anegando el citoplasma. Esta mitocondria no solo es incapaz de sintetizar ATP si no que además, consume los recursos restantes. Si los trastornos metabólicos provocados por la sustancia tóxica tienen tal trascendencia se puede dar una catástrofe bioenergética que desembocará en el agotamiento del ATP celular y culminará en lisis celular.

Cuando la afectación no es grave, se presenta el fenómeno de autofagia en las mitocondrias dañadas, dando paso al funcionamiento de las mitocondrias intactas o levemente dañadas facilitando la sobrevivencia celular, por lo tanto, cuando la cantidad de ATP en la células es

menor solo se reserva para actividades vitales de la célula disminuyendo considerablemente su capacidad de reproducción, reflejado en el número de individuos generados en un lapso determinado de tiempo.

6. CONCLUSIONES PARTE 1

Efectos toxicológicos del DDT en *Colpoda cucullus* (cepa silvestre y de referencia).

- * *Colpoda cucullus* cuenta con características monitoreables como daño a nivel celular (canales iónicos), poblacional (modificación en el tiempo de duplicación, concentraciones letales) y genético-bioquímico (cambios morfológicos) que evidencian el daño por el plaguicida, presentándose una clara modificación entre su comportamiento antes y después de la exposición al DDT.
- * Las concentraciones letales 90, 50 y 10 para la cepa silvestre se calcularon en 3.41, 1.81 y 0.29 mg/mL, respectivamente, mientras que para la cepa de referencia fueron de 2.58, 1.10 y 0.21 mg/mL respectivamente lo que comprueba que *C. cucullus* es altamente sensible al DDT, por lo tanto, cuenta con la capacidad de ser empleada como bioindicador y/o biosensor ambiental.
- * La cepa ATTC[®]30916, presentó una mayor toxicidad respecto a su análoga silvestre por lo que se continuó la experimentación con la cepa de referencia pretendiendo obtener resultados cuantitativos a menor cantidad de DDT.

7. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Parte 2

Uso de *Colpoda cucullus* como biosensor a contaminación por DDT mediante microscopia de fluorescencia

Para la continuación del protocolo se escogió la cepa de referencia, que fue más sensible al plaguicida y será empleada para la cuantificación e implementación del biosensor ya que emite una respuesta a menores cantidades del plaguicida.

7.1 Tinción por fluorescencia de *C. cucullus*.

Con el fin de realizar el cargado óptimo de las células con el reactivo Fura 2-AM (Invitrogen F1225) se probaron seis diluciones (0.1, 0.01 y 0.001 mM); ya que el fluorocromo tenía una concentración de 1mM en DMSO; tres usando como disolvente agua corriente y tres con buffer de fosfatos a pH 7.2.

De un cultivo se tomaron células al azar se lavaron con agua corriente y se depositaron en un tubo Eppendorf para su tinción en total oscuridad, posteriormente se observaron bajo el microscopio de fluorescencia (Zeiss, Scope A.1) a un aumento de 10 y 40x. Este procedimiento se realizó por triplicado.

La dilución ideal (FURA 2-AM en agua corriente) se seleccionó según la inocuidad del fluoróforo sobre la célula y la mayor emisión de fluorescencia después de una hora de carga.

7.2 Efecto del DDT sobre la intensidad de fluorescencia en el protozoo *C. cucullus*

Ya que las células se cargaron de una forma óptima se prosigió a observar el efecto del DDT sobre la respuesta fluorescente del protozoo. Para lo cual se prepararon 3 diluciones de DDT (Acetona:DDT:Agua corriente) a una concentración de 0.065, 0.500 y 1.500 mg/mL.

Seleccionando 10 ciliados previamente cargados con el fluorocromo se depositaron individualmente en un portaobjetos excavado con 60 μ L de la disolución prueba; después de 30 minutos de exposición se recuperaron y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia. Esta prueba se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones. El blanco de esta prueba también contó con 30 protozoos los cuales se pusieron en contacto con agua corriente.

Con esto se fijó cualitativamente la respuesta del protozoo al contaminante.

7.3 Construcción de la Curva Patrón DDT (mg/mL) vs Intensidad relativa

En esta parte experimental se fijaron ocho diluciones de DDT (DDT:Acetona:Agua corriente a las concentraciones de 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mg/mL, más un blanco (agua corriente) descartando la de 4.0 mg/mL en la cual se observa la lisis directa del protozoo. Siguiendo el procedimiento antes mencionado de tiempo y forma de exposición, se recuperaron cada uno de los 30 protozoos por dilución los cuales, se estudiaron y observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Ziess, Scope A.1) y haciendo uso de una cámara (Moticam 480) se tomó una fotografía de cada espécimen.

Cada fotografía se trabajó con un software de análisis de imagen (Visilog 7.0) para la obtención de la intensidad total de la imagen mediante el uso de histogramas y así poder obtener la intensidad promedio por cada dilución.

Ya teniendo el valor de intensidad por cada dilución se fijó una escala relativa, en la cual el 100% de intensidad está fijado por el blanco y así decrecía la intensidad relativa al aumentar la concentración de plaguicida.

Con esto se logró obtener un parámetro cuantitativo que relacionó el efecto dañino del xenobiótico sobre el microorganismo con la concentración del contaminante (DDT) a la que fue expuesto.

7.4 Interpolación de las muestras problema en el modelo experimental y su comparación estadística con la concentración de preparación

Para comprobar si la concentración obtenida experimentalmente era comparable con la concentración real a la que fue preparada la dilución se dispusieron de 3 diluciones problema a 0.03, 0.20 y 0.80 mg/mL de DDT.

Continuando con el ensayo se expusieron 10 protozoos previamente cargados con el fluorocromo a cada dilución de prueba durante 30 minutos posteriormente, se prosiguió a la toma de la fotografía; a esta siguió el proceso de análisis antes detallado. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra problema.

8. Resultados y Discusión Parte 2

Uso de *C. cucullus* como biosensor a contaminación por DDT mediante microscopia de fluorescencia

Para la continuación del protocolo se escogió la cepa ATTC®30916 ya que presentó mayor sensibilidad al plaguicida, su proceso de reproducción fue más rápido, por lo cual, se empleó para la cuantificación e implementación del biosensor ya que se esperaba que emitiera respuesta a menores cantidades del contaminante.

8.1 Tinción fluorescente de *C. cucullus*

Tabla X. Diluciones prueba del fluorocromo para el cargado de las células.

Dilución	Efecto en la célula	Intensidad aparente
1 mM	deformación y/o pérdida del movimiento celular	++
0.1000 mM	Sin daño aparente	+++++
0.0100 mM	Sin daño aparente	+++
0.0010mM	Sin daño aparente	+
0.0001 mM	Sin daño aparente	-

(+++++)=intensidad de fluorescencia máxima, (-)=sin fluorescencia

Para el cargado óptimo de las células se probaron cuatro diluciones más el Fura-2AM sin diluir sobre el protozoo durante una hora.

En estas pruebas se observó que a la concentración de 1mM las células después de una hora de cargado sufren deformación, pérdida del movimiento ciliar e incluso lisis, aunando a que se presentó el efecto de filtro interno de fluorescencia detectado en una disminución de la florescencia ante una concentración alta del cromofóro, por lo tanto, se prosiguió a la dilución del reactivo a las concentraciones mencionadas en la tabla X.

En diluciones pequeñas se puede considerar que la fluorescencia es proporcional a la concentración del fluorocromo, lo cual se evidenció mediante la disminución de la bioluminiscencia desde la concentración de 0.1 mM a 0.0001 mM. A estas diluciones no se observó daño en el protozoo después del tiempo de cargado ni efecto del filtro interno, por lo que se eligió trabajar con la concentración de 0.1mM, a la cual la emisión era máxima.

Al realizar la comparación entre las diluciones preparadas con agua corriente y el buffer de fosfatos pH 7.2 no se encontró diferencia aparente en la emisión de la fluorescencia por lo que, los siguientes ensayos se realizaron con agua corriente evitando así someter al protozoo a otra sustancia que pudiera interferir en resultados posteriores.

8.2 Efecto del DDT sobre la intensidad de fluorescencia en el protozoo *Colpoda cucullus*

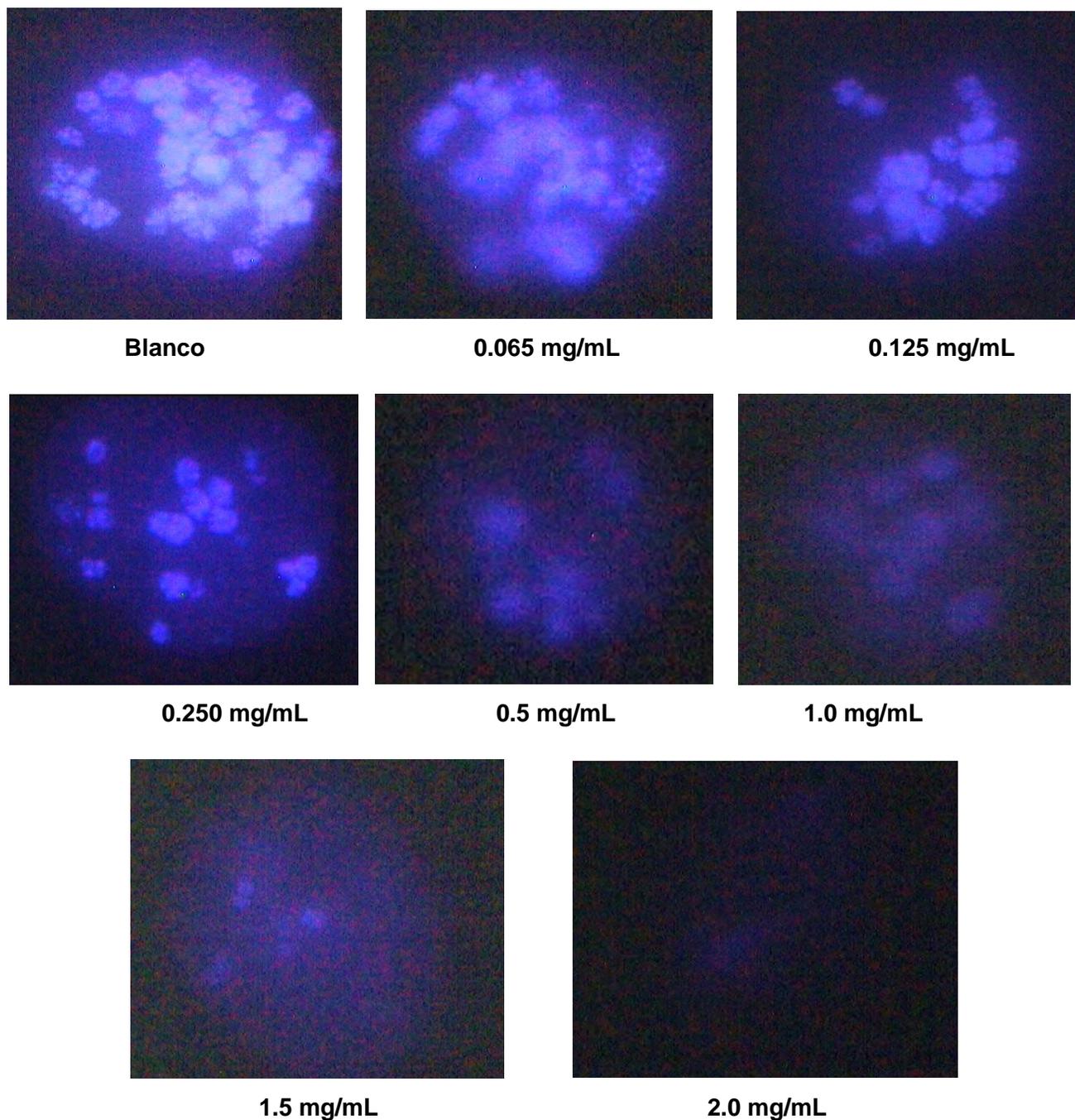
Tabla XI. Modificación cualitativa de la intensidad de fluorescencia al elevar la concentración de DDT.

Dilución DDT (mg/mL)	Intensidad de fluorescencia aparente
0.065	++++
0.500	++
1.500	+

Debido a que el DDT provocó la salida del Ca^{2+} citoplasmático previamente quelado con el cromóforo se dio una disminución en la fluorescencia, esto aún en concentraciones a las que no se había observado daño aparente en la determinación de la CL_{50} (punto 5.1.3) por lo que, el DDT produce daño a menores cantidades de las antes estudiadas reafirmando su efecto altamente tóxico sobre este tipo de microorganismo (Tabla XI). Con esto se determinó que la técnica de fluorescencia, la selección del FURA 2-AM y el uso de la bioluminiscencia como factor de respuesta a la afectación del plaguicida eran parámetros útiles en el diseño del biosensor.

8.3 Pérdida de la intensidad de fluorescencia respecto a concentraciones variables de DDT

Tabla XII. Influencia del DDT en la fluorescencia emitida por *C. cucullus*.



La intensidad emitida por la célula a la concentración de 3.0 mg/mL no era detectable para la cámara (Motic 2.8)

Al someter el protozoo a las diferentes concentraciones del DDT destaca:

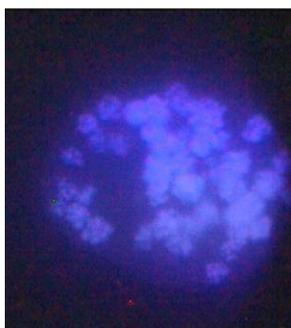
La efectividad del fluorocromo obteniendo una bioluminiscencia máxima en las células blanco, las cuales al tener su membrana intacta mantuvieron el Ca^{2+} citoplasmático quelado en su interior, además se notó que el reactivo presenta una alta estabilidad a la luz, pH, hidrólisis y conservación en condiciones de congelación y oscuridad.

La concentración más alta de exposición fue de 3.0 mg/mL a esta cantidad de contaminante el daño sobre el protozoo es importante, observando al microscopio una muy baja fluorescencia la cual no era detectada por el elemento transductor lo que evitó la cuantificación de la intensidad y por ende, la afectación de *C. cucullus* a esta concentración de contaminante.

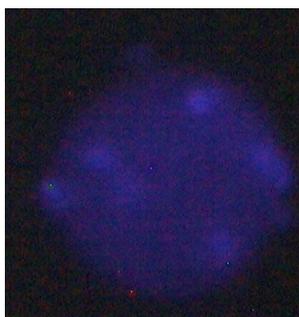
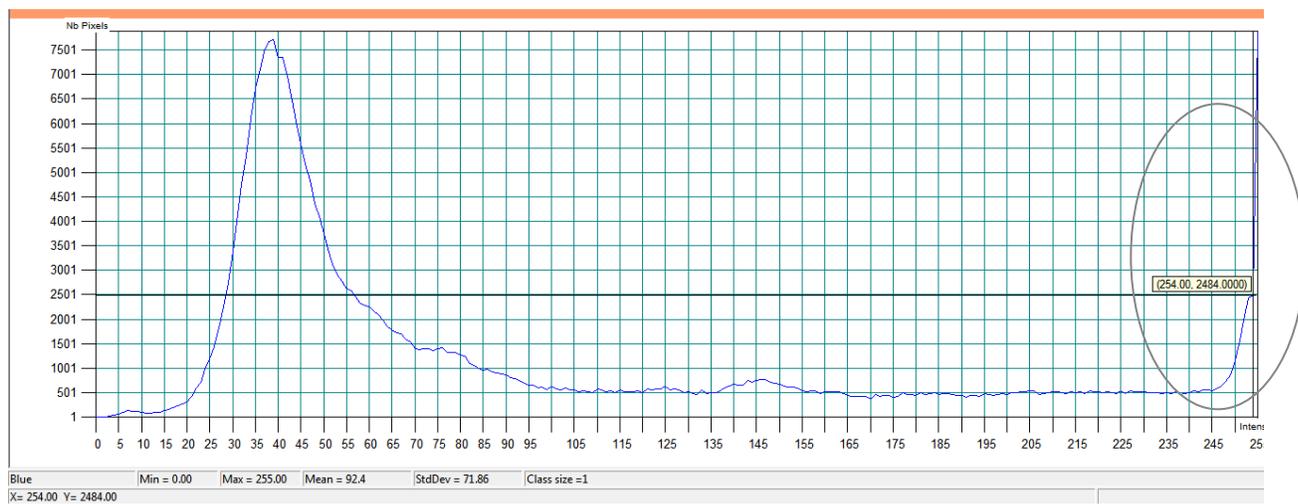
Parte del mecanismo tóxico del DDT implica el bloqueo de los canales iónicos dependiente de voltaje los cuales al no cerrarse, dan paso a la formación de poros provocando la salida de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , en consecuencia la concentración de estos iones se ve notablemente disminuida al incrementar la cantidad de contaminante; esto se observó claramente en las diluciones de 0.065 hasta 3.0 mg/mL.

Para el desarrollo de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia o bioluminiscencia se trabajó con el programa de análisis de imagen Visilog 7.0 como medio en la detección de la intensidad de la fluorescencia emitida por el calcio en el citoplasma del microorganismo expuesto.

En la imagen adquirida por la cámara se obtuvo la intensidad total de la imagen mediante el uso de histogramas, en los que se observaban dos picos de tamaño importante: el primero, responsable de la intensidad en la mayoría de la imagen (fondo negro) y el segundo pico debido a la intensidad del fluorocromo (Figura 19).



1.



2.

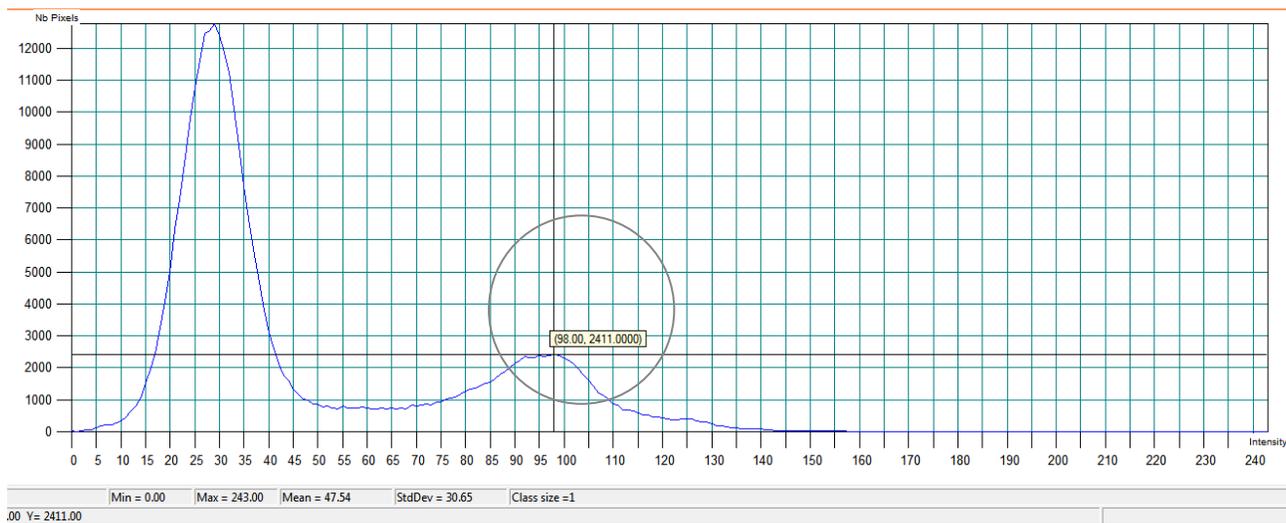
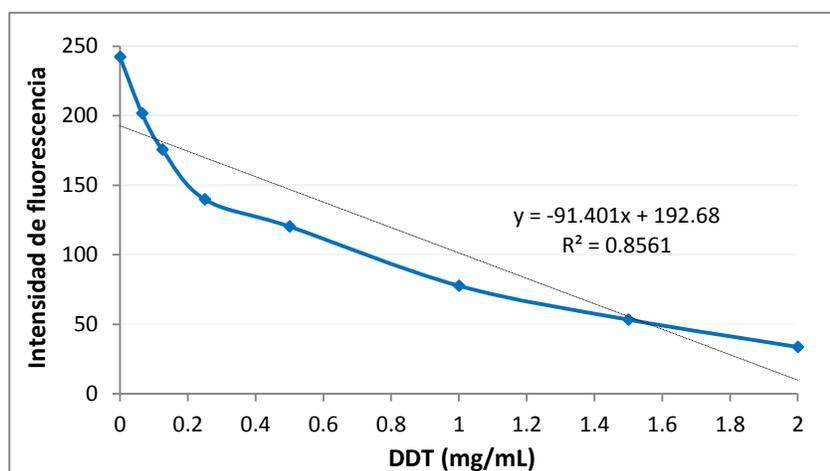


Figura 19. Ejemplo de los histogramas obtenidos en base a las imágenes muestra (1 y 2) a partir de los cuales se cuantificó la intensidad de fluorescencia de *C. cucullus*.

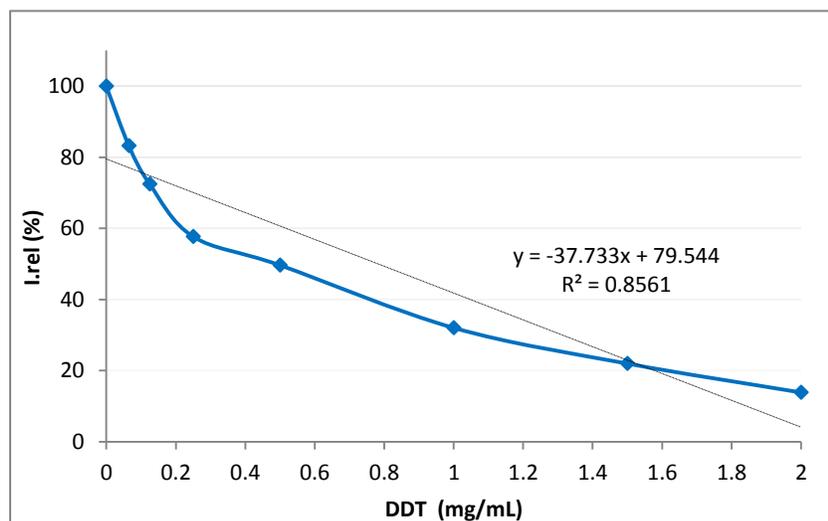
Se obtuvieron 30 intensidades por dilución las que se promediaron para obtener un valor puntual. Obtenidas las intensidades absolutas se calcularon las intensidades relativas en porcentaje; dicho procedimiento se realizó tomando en cuenta el valor del blanco (242) como el 100% y así sucesivamente. Las intensidades relativas obtenidas se presentan en la tabla XIII.

Tabla XIII. Intensidad de fluorescencia vs Concentración de DDT (mg/mL)

Dilución (mg/mL)	Blanco	0.065	0.125	0.25	0.5	1.0	1.5	2
Intensidad absoluta	242	202	176	140	120	78	55	34
Intensidad relativa (%)	100	83	72	58	50	32	22	14



Gráfica 4. Intensidad absoluta de fluorescencia vs DDT (mg/mL).



Gráfica 5. Intensidad relativa vs DDT (mg/mL).

Con esto se logró obtener un parámetro cuantitativo que relaciona el efecto dañino con la concentración de DDT al que fue expuesto el microorganismo (Gráfica 4 y 5).

8.4 Interpolación de las muestras problema en el modelo exponencial

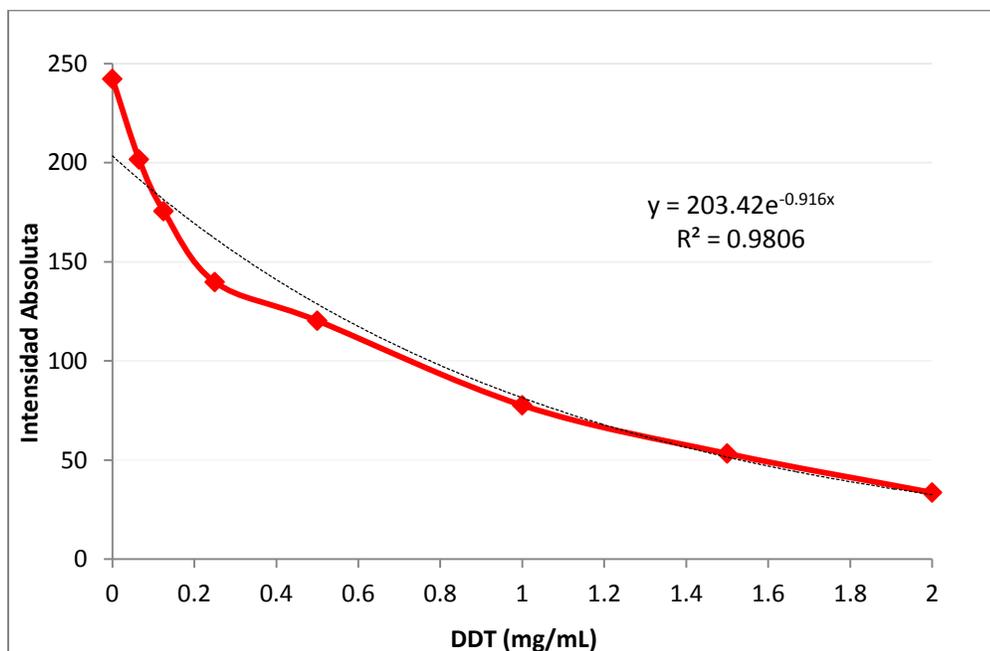
Se prepararon tres diluciones de DDT a diferentes concentraciones y se trabajaron como muestras problema interpolando sus intensidades en la curva patrón absoluta y relativa, arrojando los valores experimentales expuestos en la tabla XIV.

Tabla XIV. Intensidades relativas y absolutas para las diferentes muestras problema

Concentración de DDT en la dilución prueba (mg/mL)	0.030	0.15	0.80
Intensidad absoluta	215	169	90
Intensidad relativa (%)	89	70	37

Para obtener el cálculo de la concentración experimental se realizaron algunas consideraciones a la curva patrón:

- * Se descartó el uso de la regresión lineal ya que sólo el 0.85 de los datos se ajustan a este diseño y no con una proporcionalidad clara. Esto se atribuye a que en experimentos biológicos existen variables externas que afectan la respuesta del microorganismo, por ejemplo, la variabilidad biológica; por lo tanto se buscó otro modelo que se adaptara más al comportamiento de los datos experimentales.
- * El diseño que se utilizó fue un no lineal: la relación exponencial; en la que se maneja implícitamente la afectación por parámetros no controlables o variables independientes adicionales, además de que se ajusta un 0.98 a los datos obtenidos. (Gráfica 6).



Gráfica 6. Intensidad absoluta vs [DDT] mg/mL. (Modelo exponencial)

Establecida la curva (Gráfica 6) se realizó la interpolación de los datos de intensidad absoluta y se calculó la concentración simulada a la que se sometió el protozoo.

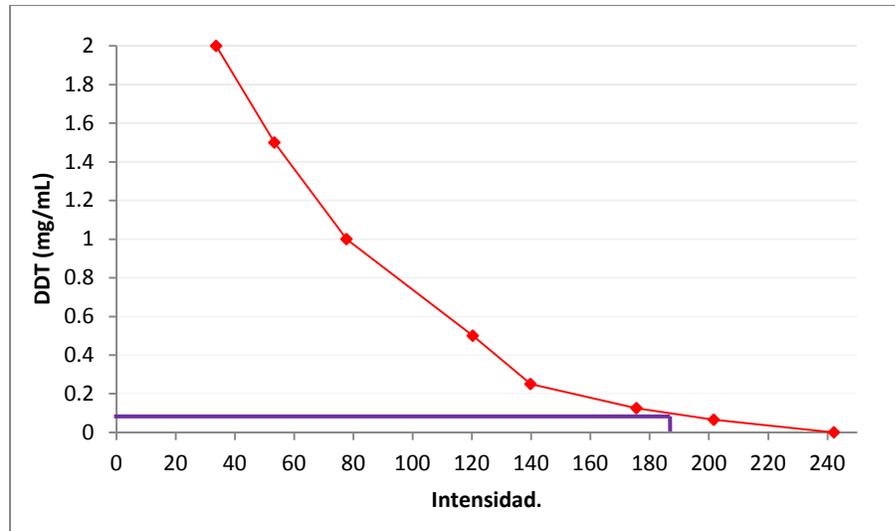
Tabla XV. Comparación entre la concentración real de la muestra y la obtenida por interpolación en la curva patrón.

	M1	M2	M3
Concentración de DDT en la dilución prueba (mg/mL)	0.030	0.15	0.80
Concentración obtenida por interpolación (mg/mL)	-0.06	0.20	0.90

Para las muestras 2 y 3 se observa que la concentración obtenida por interpolación es más alta que la experimental, mientras que para la muestra 1 se obtuvo un resultado negativo esto provocado por la baja sensibilidad de la metodología.

Como se observa en la ecuación de la gráfica 4 es posible interpolar muestras con una intensidad mayor a 192.68, por lo que no se detectarán concentraciones menores de 0.1

mg/mL, (Gráfica 7). Dado lo anterior esta curva se vuelve limitada en la determinación de bajas concentraciones.



Gráfica 7. Restricción del aparato detector.

Aplicándose el análisis de prueba de hipótesis ($\alpha=0.5$) se encontró que para todas las muestras problema existe una diferencia significativa respecto a la concentración real de su preparación. Esta divergencia se puede atribuir a los diferentes factores implicados en el proceso como son: mantenimiento de la cepa, preparación de diluciones, puntos críticos en el proceso de tinción, exposición; obtención de los datos cuantitativos y a la sensibilidad de la cámara principalmente (detector).

9. CONCLUSIONES PARTE 2

Uso potencial de *C. cucullus* como biosensor a contaminación por DDT mediante microscopía de fluorescencia

- * Mediante el modelo propuesto (microscopía de fluorescencia, FURA 2-AM y Visilog 7) se logró cuantificar el deterioro provocado por el DDT a los canales iónicos y por ende a membrana celular, aún a concentraciones menores a las estudiadas en la obtención de la concentración letal, observándose como respuesta toxicológica la pérdida de la bioluminiscencia al aumentar la cantidad de DDT.
- * La técnica de microscopía de fluorescencia, el fluorocromo FURA 2-AM y el programa Visilog 7 evidenciaron ser herramientas útiles como elementos transductor y procesador de un biosensor ambiental.

10. Conclusión General

Colpoda cucullus demostró ser un elemento biológico útil en la cuantificación de DDT a nivel laboratorio, relacionando parámetros estructurales y de mortalidad dedicados al establecimiento de niveles tóxicos o letales dentro de sistemas biológicos, por lo tanto, este modelo puede ser aplicado en la implementación de un biosensor encaminado a la medición de compuestos contaminantes con limitada degradación.

11. Perspectivas futuras

En trabajos próximos se pretende extrapolar los resultados obtenidos a nivel laboratorio en el diseño y construcción del biosensor, el cual, será empleado en muestras ambientales de agua principalmente; comparándose sus resultados con otras técnicas de detección y

cuantificación de plaguicidas como la cromatografía, para optimizar su funcionamiento y manejo, buscando cumpla con las características ideales antes mencionadas.

Como punto final del proyecto se plantea el uso alternativo y posible comercialización del diseño innovador del biosensor dentro ámbito del ambiental, dirigido al control de contaminación por compuestos organoclorados, específicamente DDT.

Bibliografía

1. Aguilar G., Iza A. (2009) Derecho Ambiental en Centroamérica. UICN. 2:503-504
2. Aislabie M., Richards N., Boul H. (1997) Microbial degradation of DDT and its residues. *New Zealand Journal of Agriculture Research*, 40: 269-282.
3. Ba. (2010) Oxidaciones, Reducciones e Hidrólisis de compuestos orgánicos. 1-14 págs.
4. Ballschmitter, K.; Wittlinger, R. (1991). Interhemisphere Exchange of Hexachlorocyclohexanes, Hexachlorobenzene, Polychlorobiphenyls and 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane in the Lower Troposphere. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 1103- 1111.
5. Brown M., Taylor V. (1931) A study of the condition of encystment of *Colpoda Cucullus* *Physiological Zoölogy*. 620-634 págs.
6. Brown M., Taylor V. (1937) The kinetics of excystment in *Colpoda Duodenaria*. *The Journal of General Physiology*: 475-500 págs
7. Botello A., Rendón J., Gold-Bouchot G., Agraz C. (1996) Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental. Diagnóstico y tendencias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2ª edición 238 págs.
8. Capo. (2010) Principios de ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Tébar. 140-145 págs.
9. Costa M., Gutiérrez J., Hernando J., Hernando I., Martín A., Moreno M. (2002) Indicadores edáficos, vegetales y microbianos (ciliados colpódidos) de procesos de desertificación. *Anales de Biología*. 24: 175-183.
10. Castillo. (2004) Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto Mexicano de la Tecnología del Agua. 142-144 págs.
11. Castiñeiras L., Arderiu F., Queraltó C. (1998) Bioquímica Clínica y patología molecular. *Revérte*, 234-237.
12. Castro O. (2012) Uso potencial de *Colpoda Cucullus* (Müller, 1773) como biosensor de plaguicidas organoclorados asociados al suelo Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de ciencias, UNAM. 73 págs.
13. Castro O. (2004) Evaluación de la toxicidad de lixiviados de recorte de perforación sobre el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de ciencias, UNAM. 90 págs.
14. Castro O., Luna P., García C., Rodríguez Z., Hernández F., Licona A. (2012) Toxicological effect of DDT in *Colpoda cucullus* and forming environmental biosensor. *Int. Res. J. Microbiol.* (ISSN: 2141-5463). 3(4): 117-126.

-
15. Castro O., Luna P., Villalobos P. (2007) Estado del arte y perspectiva del uso de biosensores ambientales en México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23(1):35-45.
 16. Chang Y., Feng L., Miao W. (2011) Toxicogenomic investigation of *Tetrahymena thermophila* exposed to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), tributyltin (TBT), and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Sci China Life Sci.*, 7: 54.
 17. Cok W. Cok K., Rueggeberg. (1947) Synthesis of DDT with Chlorosulfonic Acid as Condensation Agent *Ind. Eng. Chem.*, 39 (7): 868–870.
 18. Costa M., Gutiérrez J., Moreno M. (2007) Indicadores edáficos, vegetales y microbianos (ciliados colpódidos) de procesos de desertificación. *Anales de biología*, ISSN 1138-3399, 24:175-185.
 19. Díaz S., Martín G., Gutiérrez J. (2006). Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa *Environment International*, 32:711–717.
 20. Deogracias M., Yáñez L., Díaz F. (2009) Comportamiento Ambiental del DDT y de la Deltametrina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México
 21. Dawson J., Campbell C., Cameron C., Paton G. (2005) Linking biosensor responses to Cd, Cu and Zn partitioning in soil. *Environ. Pollut.* 142: 493-500
 22. Fernández B., Yarto R., Castro D. (2010) Las sustancias tóxicas persistentes. INE 21-25 págs.
 23. Funatami R., Kida P., Wato T., Matsuoka T. (2010) Morphological events during resting cyst formation in the ciliate *Colpoda cucullus* *Protistology* 6 (3):204–217.
 24. González R., García I., Ruiz G., Gago C. (2005) Aplicación de biosensores en la industria agroalimentaria. *Miod.* 16-31 págs.
 25. Inventario de plaguicidas obsoletos y sitios contaminados con estos (2008). INE 8-11 págs.
 26. Invitrogen (2011) Fura and Indol Rationetric Calcium Indicators. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp01200.pdf> (fecha de consulta 23.01.13)
 27. Juarez J., Villagrana A., (2010) Toxicidad aguda y crónica del lindano sobre *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera: Daphniidae) *Rev. Peru. biol.* 17(3): 371 – 376.
 28. Kidder W., Lloyd C. (1990) Cytological investigations of *Colpoda cucullus* *The Journal of General Physiology* 178-197 págs.
 29. Klaassen. (2005) Fundamentos de Toxicología. Mc Graw Hill 31-41, 341-344 págs.
 30. Madoni P., Giuseppa R. (2005) Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution* 20:1-7.
 31. Malgaroli A., Milani D., Meldolesi J., Pozzan T. (1987) Fura-2 Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cell *The Journal of Cell Biology*, 105: 2145-2155.
 32. Montelongo. (2012). La regulación jurídica de los Plaguicidas en México.
-

-
33. Muller A, Muller W. (1970) *Colpoda cucullus*: A terrestrial Aquatic. The American Midland Naturalist, 84:1-11.
 34. Norma Oficial Mexicana NOM-032-FITO-1995. Diario Oficial de la Federación. Fecha de Publicación: 08-01-97 Fecha de Entrada en Vigor: 09-01-97
 35. Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009. Diario Oficial de la Federación. Fecha de Publicación: 13-04-10
 36. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación. Fecha de Publicación 18-12-10 Fecha de Entrada en Vigor de: 18-03-11
 37. Norma Oficial Mexicana NOM-003-STPS-1999. Diario Oficial de la Federación. Fecha de Publicación: 28-12-99. Fecha de Entrada en Vigor: 28-06-00
 38. Norman L. Química Orgánica (1984) Reverté 2ª Edición 1110-1112 págs.
 39. Ponce G., Cantú P. (2006) Modo de acción de los insecticidas. RESPYN. 7(4):6-16
 40. Otero. (2001) Medio ambiente y educación para docentes. 103-109 págs.
 41. Pachón A. (2009) Plaguicidas Organoclorados. 4-9 págs.
 42. Prado G., Sierra S., López L., Albores A. (2002) Biotransformación y efectos sobre el metabolismo de xenobióticos del DDT. CINVESTAF 2I (3): 190-200.
 43. Ramírez, J., Lacasaña (2011) Plaguicidas. Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición Arch Prev Labor; 4(2):67-75.
 44. Raz, G. A. (2000). Crustáceos y Poliquetos. Organismos Indicadores de la Calidad del Agua y de la Contaminación (Bioindicadores) 265-307 págs.
 45. Repetto. (1997) Toxicología Fundamental. Días de Santos 117-121 págs
 46. Solecki R. (2000) Pesticide residues in food: DDT Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, Germany
 47. Starodub N., Pilipenko V., Pilipenko N., Katsev (2010) Express control of toxicity and content of patulin by optical biosensors. NSTI-Nanotech. 3:137-140.
 48. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol.Bio. Evol. 24:1596-1599.
 49. TefLabs products. <http://www.teflabs.com/ion-indicators/> (Fecha de consulta 23.01.13)
 50. Trujillo Ramírez. (2006) Análisis de Pesticidas por Cromatografía de Gas. Un modelo operacional. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 17-18 págs.
 51. Trielli F., Chessa G., Amaroli A., Ognibene., Delmonte C. (2006) Effects of organophosphate compounds on a soil protist, *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodidae) Chemosphere 65: 1731–1737.
 52. Vázquez S., Castro M., González M., Pérez R., Castro B. (2006) Bioindicadores para determinar la calidad del agua. ContactoS, 60: 41-48
-

53. Vázquez B., Rendón J., Bouchot G., Hernández A. (2005) Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias 239-247págs.

54. Williamson K., Masters K. (2011) Macroscale and microscale organic experiments Cengage Learning. 2 Edition. 420-421 págs.