



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN SEDIMENTOS Y BIOMARCADORES
EN GAMBUSIA YUCATANA EN CUERPOS DE AGUA DE YUCATAN
MEXICO: APLICACIONES PARA MANEJO AMBIENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN MANEJO SUSTENTABLE DE ZONAS
COSTERAS

P R E S E N T A :

HERNANDEZ MARQUEZ ESPERANZA ESTEFANIA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA.GABRIELA RODRIGUEZ FUENTES
Unidad Académica de Yucatán, México 2017

Sisal, Yucatán, México



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	10
BIOMARCADORES	10
BIOMARCADORES USADOS EN MONITOREO	12
VALIDACION DE LOS BIOMARCADORES	¡Error! Marcador no definido.
<i>Gambusia yucatan</i>	20
CASOS DE ESTUDIO Y OTRAS HERRAMIENTAS UTILIZADAS PARA CONOCER LA CONTAMINACION POR	
PLAGUCIDAS EN LA ZONA NOROESTE DE YUCATAN, MEXICO	23
INCORPORACIÓN DE LOS PLAGUCIDAS AL MEDIO AMBIENTE	25
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPOTESIS	29
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Acetilcolinesterasa:	¡Error! Marcador no definido.
Glutación-S-transferasa (GST):	35
Glutación Total (GSH):	36
Análisis de sedimentos	37
RESULTADOS Y DISCUSION	43
Aplicaciones en manejo ambiental.....	68
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFIA	76
ANEXOS	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales rutas de biotransformación

Figura 2: Esquema de una sinapsis colinérgica.

Figura 3: Biomarcadores y tejidos que pueden determinarse en un solo organismo para obtener respuestas integradas

Figura 4: Características deseables de un biomarcador según WHO, 2001

Figura 5: Distribución de *G. yucatanana* en el centro, norte y oriente de la Península de Yucatán.

Figura 6: Principales tejidos que se utilizan para el análisis de biomarcadores en *G. yucatanana*

Figura 7: Introducción de los plaguicidas a la cadena alimentaria (Monterrosa 1998)

Figura 8: Preparación de las muestras de musculo en *G. yucatanana*

Figura 9: Zona de estudio. Mapa tomado de Google earth TM y editado en ArcMap™

Figura 10: Muestras de sedimentos después de haber sacado de centrifuga

Figura 11: Cromatógrafo de Gases para análisis de muestras de sedimentos en Laboratorio de Química UNAM Sisal

Figura 12: Actividades enzimáticas promedio de AChE en machos y hembras de *G. yucatanana* por estación

Figura 13: Actividades enzimáticas promedio de GSH en hembras y machos de *G. yucatanana* por estaciones

Figura 14: Actividades enzimáticas promedio de GST en hembras y machos de *G. yucatanana* por estaciones

Figura 15: Gráficas de concentraciones de plaguicidas encontradas en sedimento de los grupos: HCHs, Clordanos, Drines y ddt y metabolitos en cada estación de muestreo

Figura 16: Gráficas de concentraciones de plaguicidas encontradas en sedimento de los grupos: Endosulfan, Metoxicloro, Clorpirifos y Plaguicidas Organoclorados totales en cada estación de muestreo

Figura 17: Actividades de AcHE y GST, y concentración de GSH obtenidas en hembras de *G. yucatanana* de acuerdo a la metodología seguida (Beliaeff y Burgeot 2001).

Figura 18: Actividades de AcHE y GST, y concentración de GSH obtenidas en machos de *G. yucatanana* de acuerdo a la metodología seguida (Beliaeff y Burgeot 2001).

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios de colecta

Tabla 2. Iones seleccionados para la operación en modo SIM para la identificación y cuantificación de cada compuesto

Tabla 3: Preparación de curva de Calibración

Tabla 4: Análisis de Spearman para correlación de las de actividades enzimáticas AChE y GST, y concentración de GSH en machos con datos morfométricos (largo tota, largo patrón ancho)

Tabla 5: Análisis de Spearman para correlación de las de actividades enzimáticas AChE y GST, y concentración de GSH en hembras con datos morfométricos (largo tota, largo patrón ancho)

Tabla 6: Kruskal Wallis. Actividades enzimáticas y actividad promedio de machos en G. yucatanana por estación

Tabla 7. Actividades principales y superficies agrícolas sembradas en los 27 municipios que abarca la zona anillo de cenotes de acuerdo al Anuario Estadístico y Geográfico de Yucatán 2015

Tabla 8. Cultivos sembrados según el Anuario Anuario Estadístico y Geográfico de Yucatán 2014

Tabla 9. Áreas sembradas con diferentes tipos de tecnología por municipios de muestreo. Datos de encuesta Nacional INEGI. 2007

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1: Actividad enzimática promedio de la enzima AChE en G. yucatanana

Gráfica 2: Actividad enzimática promedio de glutatión total en G. yucatanana

Gráfica 3: Actividad enzimática promedio de glutatión S-transferasa en G. Yucatanana

RESUMEN

En este trabajo se presenta la evaluación de diferentes biomarcadores de efecto en el músculo de *Gambusia yucatanana*/ guayacón yucatecosilvestres que fueron recolectadas en épocas de secas durante el mes de mayo en el año 2014 en 6 cuerpos de agua que se encuentran a lo largo de la zona anillo de cenotes. Se buscó determinar la relación de los biomarcadores con la concentración de plaguicidas organoclorados en los sedimentos. Los biomarcadores que se evaluaron fueron: actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como biomarcador de neurotoxicidad, la concentración de Glutación total (GSH) y la actividad de la enzima Glutathion S-transferasa como biomarcadores de balance redox y de desintoxicación. Debido a que existen reportes de que estos biomarcadores pueden tener variaciones entre organismos, se determinó si presentaban un efecto de talla y sexo.

Los resultados indicaron diferencias significativas entre sexos para cada biomarcador medido, para AChE se obtuvo menor actividad promedio en hembras (90.23 nmol/min/mg proteína) que en los machos (156.5 nmol/min/mg proteína). En GSH se presentó una actividad promedio mayor en hembras 0.168 nmol/mg tejido que en machos 0.1188 nmol/mg tejido. En la actividad de GST se obtuvo una actividad promedio mayor en machos (1.307 umol/min/mg proteína) que en hembras (0.833umol/min/mg prot). La correlación con datos morfométricos y los biomarcadores medidos indicó que no existe correlación ni linealidad. Adicionalmente se determinó que no existen diferencias significativas en los valores de los biomarcadores utilizados entre estaciones para machos y hembras.

Fue posible cuantificar plaguicidas organoclorados en el sedimento de todos los sitios muestreados; E4 (Tetiz), E6 (Carretera Kinchil-Sinkeuel), E10 (Yaxcopoil), E13 (Pixyah), E19 (Hompun) E22 (Santo Domingo Buctzotz) (. Los plaguicidas que se encontraron en mayor concentración son los HCHs y el endosulfán. Con respecto al límite umbral de riesgo para el endosulfán (0.026 ng/g), se determinó que para prácticamente todas las estaciones (excepto E10) lo rebasaban, en algunos casos como en las estaciones E6 y E19 en un factor de miles de veces. Para el Clorpirifos, se determinó que en las estaciones que se cuantificó este plaguicida E4, E6 y E13 rebasaban por lo menos en un factor de 3 el valor del límite umbral de riesgo (1.1 ng/g).

En cuanto a la relación de resultados de los biomarcadores y las muestras de sedimentos a través del IBR (respuesta integrada de biomarcadores) se pudo observar que entre las estaciones en donde se observó un mayor valor de IBR fue para las estaciones E13, E19 y E6. Las estaciones E13 y E19 son estaciones donde se drena el agua proveniente del sur y la estación E6 que es parte de la salida del agua proveniente del sur, cerca de Celestún. Existió una discrepancia entre los sitios con mayor IBR respecto a los sitios con mayor concentración de contaminantes (especialmente la E22 que se encuentra cerca de la costa en Dzilam de Bravo), esto es debido a otros factores que no fueron considerados, como la presencia de otros contaminantes, la biodisponibilidad, la especificidad de los biomarcadores empleados y al hecho de que las mezclas de contaminantes son únicas en cada muestra. Dada la falta de regulación en el uso de plaguicidas en la región y debido a que se han medido plaguicidas de uso restringido y/o prohibido como lo es el endosulfán, que en algunas estaciones se rebasó el límite de umbral de riesgo permitido internacionalmente, y a que se observa una relación con el efecto medido en biomarcadores de especies silvestres, se recomienda que se sigan haciendo biomonitoreos de la zona, para obtener datos que nos lleven a un mejor manejo del uso de plaguicidas en el estado de Yucatán.

INTRODUCCIÓN

La comunidad internacional a través del Convenio de Estocolmo ha incluido a algunos plaguicidas organoclorados como; aldrín, clordano, dieldrín, heptacloro, hexaclorobenceno, diclorodifeniltricloroetano (DDT) dentro de los 12 contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) o POPs por sus siglas en inglés, debido a que se ha comprobado que su uso produce efectos en el ecosistema y en la salud humana (FAO, 2016; Martínez y Gavilán, 2004).

Una de las características principales de los plaguicidas organoclorados, es que son sustancias estables químicamente, por lo que son difícilmente biodegradables, lo cual hace que su vida media en el ambiente pueda ser superior a los 10 años (Padilla Vivas *et al.*, 2005). Los plaguicidas organoclorados son generalmente listados junto con otros COPs.

Los COPs son liposolubles, lo que significa que tienen tendencia a concentrarse en los tejidos grasos de los seres vivos a lo largo de su vida. Algunos pueden incrementar su concentración al ascender en la cadena trófica, presentándose en algunos casos la biomagnificación (Padilla Vivas *et al.*, 2005; Rendón-von Ostén *et al.*, 2005).

Los daños que se ha identificado que causan los plaguicidas a los seres vivos van desde alteraciones del sistema inmunológico o endocrino, desarrollo de cáncer, reducción en la reproducción e incluso, hasta la muerte (Cobos Gasca *et al.*, 2011).

En la actualidad son cada vez más los estudios que se interesan en la contaminación de sustancias químicas en las que se espera no solamente conocer los niveles de contaminantes en el medio biótico y abiótico, sino los efectos que estos compuestos pueden causar en los organismos, poblaciones y las comunidades (Gold Bouchot *et al.*, 2005).

Yucatán es uno de los estados donde actualmente se conoce que el uso de los plaguicidas se incrementó considerablemente desde que hubo una reordenación henequenera y su uso se ha diversificado de acuerdo a la variedad de cultivos de la región (Cobos Gasca *et al.*, 2011). Se ha identificado que uno de los grupos de plaguicidas que mayormente se utiliza en la región son los plaguicidas organofosforados que son muy tóxicos para aves, peces y mamíferos. Igualmente, se identifica el uso de plaguicidas organoclorados, principalmente el DDT, que se ha usado para el control del mosquito transmisor del paludismo durante campañas de salud, así como en la agricultura hasta su prohibición en 1991 (Cobos Gasca *et al.*, 2011; Pacheco Garrido *et al.*, 2014).

Cobos Gasca *et al.*, (2011), Pérez Herrera *et al.*, (2012) y Poot Angulo *et al.*, (2015) señalan que los problemas que tienen los agricultores y que afectan a la calidad ambiental, y que además ponen en riesgo la salud humana en el estado, es que aplican las sustancias agroquímicas de manera inadecuada, no utilizan equipos de protección, aplican dosis excesivas y desechan los envases en los campos de cultivo. Esta situación sumada a la naturaleza cárstica del suelo de la región, la cual permite que se infiltre rápidamente el agua de la lluvia al agua subterránea (único medio de abastecimiento potable), así como las propias características químicas de cada plaguicida, ocasiona la persistencia de plaguicidas en diferentes compartimientos ambientales.

La Península de Yucatán, en términos de su geología es dividida en tres partes, el este de la península, la zona central y la zona noroeste. La zona noroeste es un área mejor conocida y ha sido muy estudiada tanto por investigadores mexicanos como por investigadores extranjeros. En esta parte, es donde se encuentra el Cráter de Chicxulub, por lo cual, la geología de esta zona ha recibido mucha atención a partir de la década de los noventa, y se le conoce como “anillo de cenotes” (Marín Stillman *et al.*, 2005).

La zona noroeste de Yucatán actualmente ha recibido atención en cuanto a la presencia de sustancias químicas tóxicas como los plaguicidas organoclorados. Cobos Gasca *et al.*, (2011); Pacheco Garrido *et al.*, (2014) y Cobos Gasca *et al.*, (2014), han reportado en diferentes cuerpos de agua que son parte del anillo de cenotes la presencia de plaguicidas como: aldrin, clordano, HCH, endosulfán, endrìn, heptacloro, metoxicloro, DDT y sus metabolitos, compuestos que además de causar daños en el ambiente pueden ocasionar daños en los organismos endémicos.

La zona hidrológica anillo de cenotes tiene aproximadamente 5 kilómetros de ancho con un radio de 90 km, cuyo centro cae en la localidad de Puerto (municipio de Progreso) y que ha mostrado ser una zona de alta permeabilidad cuyo flujo de agua subterránea se presenta del sureste hacia el noroeste. Parte del perímetro del anillo de cenotes se encuentra en tierra continental, abarcando 27 municipios (de este a oeste) del Estado de Yucatán (Méndez-González, 2010).

Ante la preocupación internacional que existe sobre la regulación de COPs, así como a la vulnerabilidad de contaminación por la naturaleza cárstica de la Península de Yucatán y a un creciente número de reportes sobre la presencia de contaminantes en la zona, en esta tesis se evaluaron tres biomarcadores de efecto: actividades de acetilcolinesterasa (AChE), glutatión S-transferasa (GST) y la concentración de glutatión total (GSH) en organismos de *G. yucatanana* tomados de 6 cuerpos de agua localizados en la zona anillo de cenotes en épocas de secas. Igualmente fueron tomadas muestras de sedimentos y se determinó la posible correlación entre los niveles de plaguicidas organoclorados en sedimento y la respuesta de los biomarcadores en los peces, con el fin de obtener información que pueda ayudar a caracterizar mejor la zona noroeste en cuanto a la presencia de plaguicidas organoclorados y su efecto en organismos silvestres. Con la información obtenida y con base en los reportado en la literatura, se realizarán recomendaciones que pueden ayudar a controlar el uso de plaguicidas y así contribuir a una mejor calidad ambiental.

ANTECEDENTES

BIOMARCADORES

Actualmente los biomarcadores son considerados herramientas útiles para evaluar *in vivo e in vitro* el seguimiento de efectos biológicos por contaminación y estrés ambiental (Rendón-von Ostén *et al.* 2005). Los biomarcadores permiten medir respuestas celulares y moleculares, así como cambios de respuestas fisiológicas o cambios de comportamiento que pueden estar relacionados con efectos por la exposición a sustancias químicas (Martin-Díaz *et al.*, 2004).

Una de las características importante de los biomarcadores es que tienen el potencial para anticipar cambios en niveles más altos de la organización biológica: población, comunidad o ecosistema. Por lo cual, desde el punto de vista regulatorio, estas pruebas biológicas pueden utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental, controlar las descargas de aguas residuales municipales e industriales, realizar estrategias de biorremediación ante daños irreversibles en el medio ambiente y defender actividades relacionadas con los contaminantes en caso de litigio ambiental (Toro-Restrepo, 2011; Martin-Díaz *et al.*, 2004).

Los biomarcadores, a pesar de que han sido sugeridos como una herramienta práctica para manejo ambiental y útiles para el seguimiento de efectos biológicos por contaminación y estrés ambiental, en general son aún poco aceptados debido a varias preguntas sin resolver como su sensibilidad, utilidad y reproducibilidad. Sin embargo, en los últimos años están siendo incorporados en evaluaciones de riesgo ambiental (Environmental Risk Assesment). Por ejemplo, los han utilizado principalmente en países de Europa para asegurar que los cuerpos de agua sean mantenidos o restaurados, así como para garantizar protección a ecosistemas acuáticos de gran valor (Toro-Restrepo, 2011).

En general hay tres tipos de biomarcadores conocidos: exposición, efecto y de susceptibilidad (National Research Council (NRC) y World Health Organization (WHO), 1993 en Martin-Díaz *et al.*, 2004).

1. Biomarcador de exposición: Permite medir una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de una interacción entre un xénobiotico y algunas moléculas o células blanco dentro de un organismo.
2. Biomarcador de susceptibilidad: Miden las características intrínsecas, ya sea genéticas o de otro tipo, así como enfermedades preexistentes que dan lugar a un aumento de la dosis interna, dosis efectiva biológica o a la respuesta del órgano blanco.
3. Biomarcadores de efecto: son utilizados para medir cambios bioquímicos, fisiológicos, de comportamiento u otra alteración dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud puede ser reconocido y asociado con una enfermedad o alteración en la salud.

BIOMARCADORES USADOS EN MONITOREO

Los biomarcadores también se pueden clasificar de acuerdo a la función que realizan dentro de la célula y de la forma que se afectan cuando son expuestos a contaminantes xénobioticos (XB). En general, los XB al entrar en el sistema biológico del organismo activan varias defensas o mecanismos de desintoxicación y biotransformación. La biotransformación de un XB consiste en incrementar la polaridad de la sustancia para posibilitar su eliminación, es decir, convertir un compuesto no polar en uno soluble en agua. Un XB en el interior del organismo puede seguir muchas rutas, pero simplificando: a) puede ser excretado sin que haya sufrido modificación alguna, con su estructura original o b) puede sufrir reacciones de transformación metabólica (Tejedor, 2006).

La Fase I del metabolismo de desintoxicación de un XB implica procesos de oxidación, reducción e hidrólisis. La Fase II implica procesos de conjugación que ocurren cuando un XB o un metabolito derivado de la Fase I es covalentemente enlazado a una molécula endógena de la Fase II para determinar la ruta y reacciones que seguirá (Tejedor, 2006). Las reacciones y rutas de la Fase II dependen principalmente del tipo de xenobiótico y puede ser diferente entre especies (Sipes y Gandolfi, 1991; en Rendón-von Ostén 2005) (Figura 1).

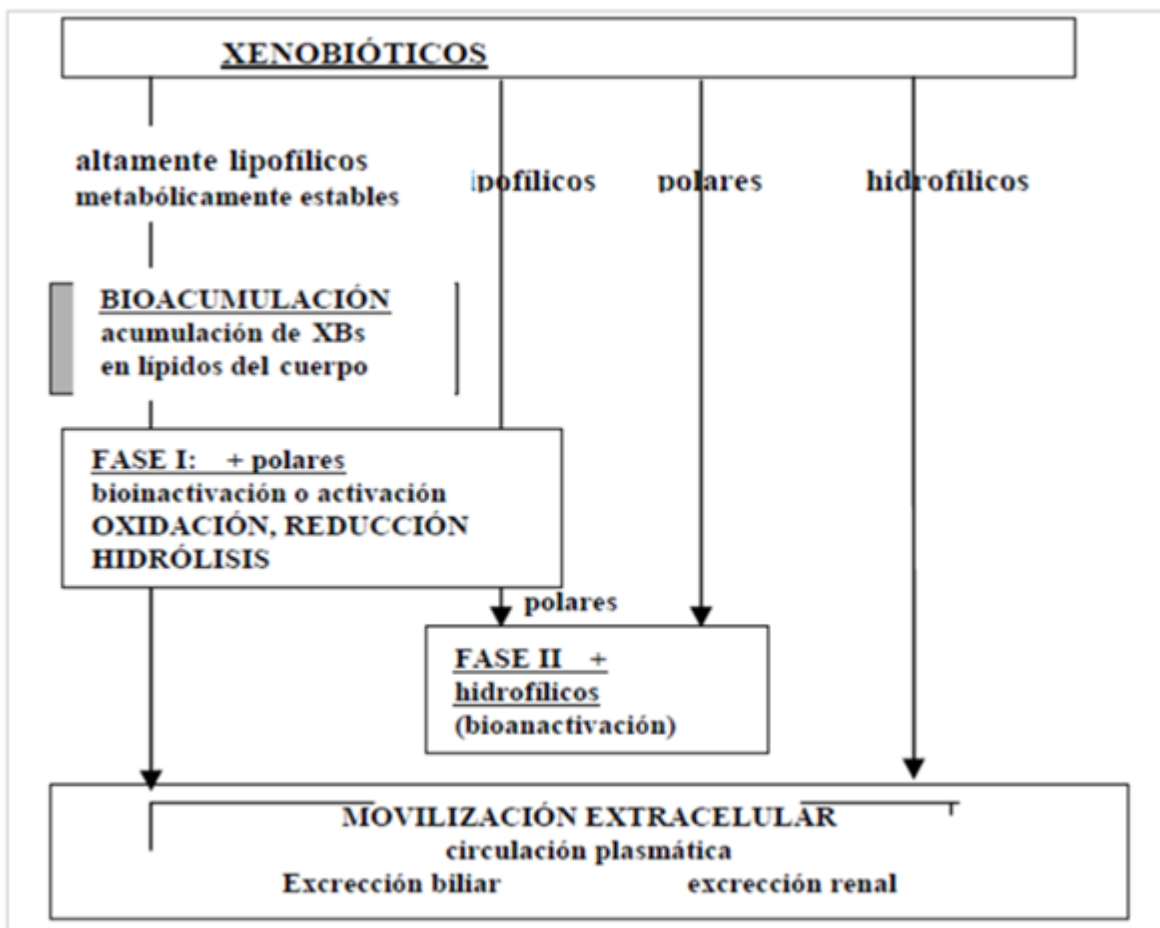


Figura 1. Principales rutas de biotransformación. Tomada de tejedor C. (2006).

Durante el proceso de desintoxicación y/o biotransformación es posible medir una variedad de biomarcadores (Rendón-von Ostén, 2015).

Algunos de los principales biomarcadores son:

- a) Biomarcadores de procesos de biotransformación de Fase I y Fase II. Las reacciones de Fase I son el primer paso en el metabolismo de los XB. Suelen consistir en la oxidación del compuesto, por lo general, la oxidación hace que el compuesto sea más hidrosoluble para facilitar las reacciones posteriores. Por ejemplo, las enzimas citocromo P450 (CYP450) son un grupo de enzimas que oxidan preferentemente los xenobióticos en reacciones de la Fase I. Las enzimas CYP450 son inducidas por los xenobióticos de una manera específica, por lo cual la obtención de datos sobre su inducción puede proporcionar información de la naturaleza de exposiciones anteriores. En el caso de las reacciones de Fase II, son el segundo paso del metabolismo de los xenobióticos, que consiste básicamente en que el compuesto oxidado se conjuga a una molécula endógena, es decir se acopla. La reacción de conjugación incrementa la hidrosolubilidad. Algunos grupos de enzimas que se catalizan en las reacciones de Fase II son las transferasas, quienes conjugan a compuestos endógenos como glutatión, aminoácidos, el ácido glucorónico o sulfatos. La molécula de glutatión es un tripéptido que se conjuga en Fase II y que se encuentra presente en todas las células, ofreciendo protección contra XB activados (Tejedor, 2006). El glutatión es un biomarcador muy empleado debido a que se conoce que su actividad se induce en diferentes especies por contaminantes como metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), policlorobifenilos (PCBs) y plaguicidas (Rendón-von Osten, 2015).

- b) Biomarcadores de neurotoxicidad: Uno de los biomarcadores de exposición que ha sido usado por muchos años para evaluar la exposición a plaguicidas organofosforados y carbámicos es la actividad de las colinesterasas. La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima reconocida en vertebrados y es muy importante su participación en el sistema nervioso porque hidroliza a la acetilcolina en la función sináptica (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2008; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2013). La inhibición de esta enzima resulta en la acumulación del neurotransmisor acetilcolina que origina una estimulación continua de los receptores localizados en la membrana postsináptica, que puede inclusive hasta producir la muerte, generalmente debido a fallo respiratorio (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008) (Figura 2).

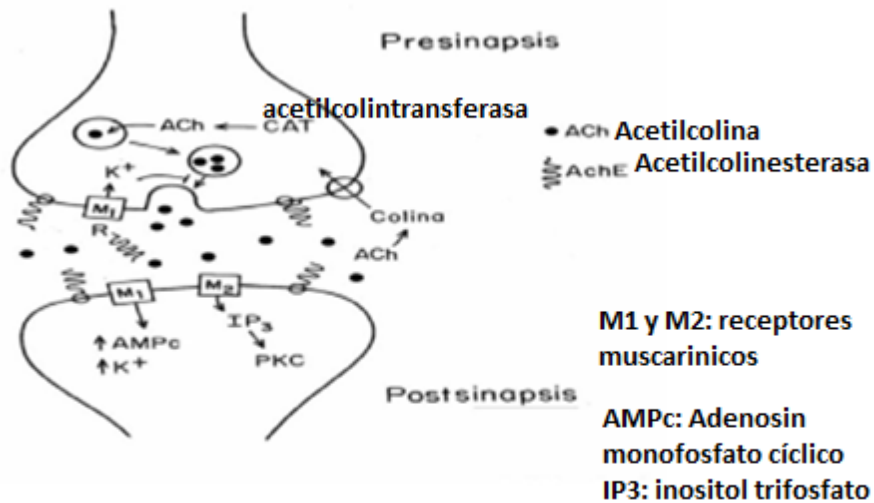


Figura 2. Interpretación esquemática de una sinapsis colinérgica de acuerdo a Sánchez y Salceda (2008). Esta ocurre en la terminal presináptica la acetilcolintransferasa (CAT) que sintetiza a la acetilcolina (ACh) a partir de la colina y acetil coenzima A. La ACh se acumula en las vesículas vía un transportador y se libera por la acción de potenciales de acción. La ACh se une con los receptores muscarínicos (M1 y M2) en la terminal postsináptica, los que transducen la señal a través de vías que involucran al adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y al inositol trifosfato (IP₃). La ACh se hidroliza por la acetilcolinesterasa (AChE) soluble o anclada a la membrana pre- y postsináptica. La colina se captura por un transporte de alta afinidad presente en la presinapsis.

- a) Biomarcadores de estrés oxidante: El estrés oxidante se genera por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante de un organismo. La alteración de defensa antioxidante puede dañar componentes celulares y tejidos que favorecen la presencia de procesos patológicos. El proceso de estrés oxidante es considerado un mecanismo de toxicidad significativo en organismos acuáticos de tal forma que ha permitido ser usada como herramienta de diagnóstico debido a que tiene la capacidad predictiva para entender el impacto de los contaminantes sobre los organismos. Entre los contaminantes ambientales o XB que se considera que inducen efectos en el estrés oxidante pueden incluirse: metales de transición, hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas organoclorados y organofosforados, piretroides, dioxinas, etc. Los principales mecanismos de defensa antioxidante son: Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutatión peroxidasa. Sin embargo, hay otras enzimas especializadas con funciones indirectamente antioxidantes que incluso han sido propuestas como biomarcadores de contaminación medida por estrés oxidante y su inducción como una respuesta específica ante la exposición a contaminantes; por ejemplo, el glutatión (GSH) que al conjugarse con la Glutatión S-

transferasa (GST), participan en el transporte y eliminación xenobióticos (Ochoa y González, 2008).

- b) Biomarcadores endocrinos: Un alterador endocrino es afectado por una sustancia o mezcla de sustancias (generalmente de plaguicidas y desechos de origen industrial y urbano) que altera la función del sistema endocrino y causa efectos adversos en la salud de un organismo, o en su progenie o a nivel de sub-poblaciones (WHO, 2001). Por ejemplo, la vitelogenina (Vtg) se puede usar como biomarcador de disrupción endocrina, ya que es una proteína producida por peces hembra y es precursora de las proteínas de reserva del huevo y, cuando se expresa en peces machos, se puede relacionar directamente con la presencia de contaminantes organoclorados, ya que algunos de ellos son considerados como disruptores endocrinos, pues cuando los niveles de VTG son altos pueden ocasionar alteraciones en el sexo de los peces machos (Rendón-Von Ostén, 2015)

En general, hay muchos biomarcadores y los anteriormente expuestos son solo un pequeño ejemplo de los tipos de biomarcadores que existen y que son útiles para monitoreos ambientales ya que, éstos se pueden medir en organismos acuáticos y los efectos presentes pueden dar indicios de la calidad de un ecosistema acuático. En la figura 3 se encuentran algunos de los posibles biomarcadores y tejidos que pueden determinarse en un solo organismo para obtener respuestas integradas (Rendón-Von Ostén, 2015).

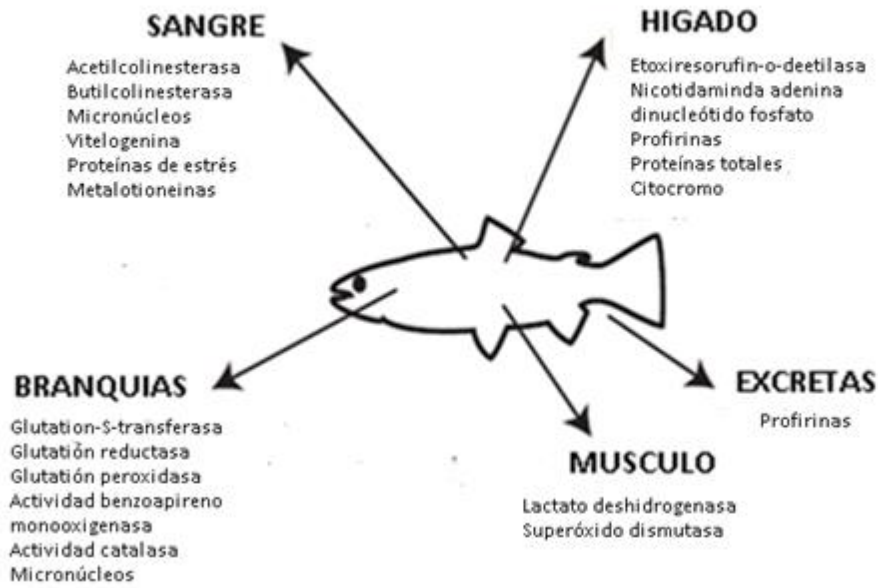


Figura 3. Biomarcadores y tejidos que pueden determinarse en un solo organismo para obtener respuestas integradas. Tomado de Rendón von Ostén (2015); en Botello *et al.* (2005)

VALIDACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

Para que los biomarcadores se consideren válidos, éstos deben de presentar una fuerte asociación con el xénobiotico, además de tener veracidad, precisión, sensibilidad, consistencia y especificidad; temporalidades definidas, gradientes biológicos amplios, evidencia experimental y que sean biológicamente aceptables (Rendón-von Ostén, 2015).

Es importante considerar que no existe un biomarcador que pueda dar información completa acerca de la calidad ambiental debido a la complejidad de los ecosistemas. Pero para que sean mejor validadas las identificaciones de alteraciones ambientales por biomarcadores, se recomienda utilizar una batería de ellos y que los resultados obtenidos sean interpretados a través de métodos multivariados (WHO, 2001; Beliaeff y Burgeot, 2002 en Rendón-von Ostén 2005). Igualmente es importante considerar el realizar estudios sobre la validación de los biomarcadores, ya que éstos varían de acuerdo a la especie, sexo, época climática, temperatura, dieta, presencia de compuestos sinérgicos o antagónicos, por lo que la selección del organismo apropiado, tejidos y biomarcadores para especies particulares en ecosistemas particulares puede minimizar los efectos o factores de confusión (Rendón-von Ostén, 2005).

Los biomarcadores en general son utilizados de acuerdo a los intereses, dificultades técnicas y costos que se le presenten al investigador. Sin embargo, es necesario que el investigador conozca la variación natural, cambios estacionales, factores bióticos y abióticos, así como metabolismo, estado nutricional, sexo, etc., y las condiciones de la geografía del hábitat, ya que los cambios solo pueden relacionarse con los niveles basales de cualquier biomarcador (Rendón-von Ostén, 2005; Pacheco Garrido *et al.*, 2014). En la figura 4 se presentan las características que deben de considerarse al utilizar un biomarcador son, de acuerdo a WHO (2001).

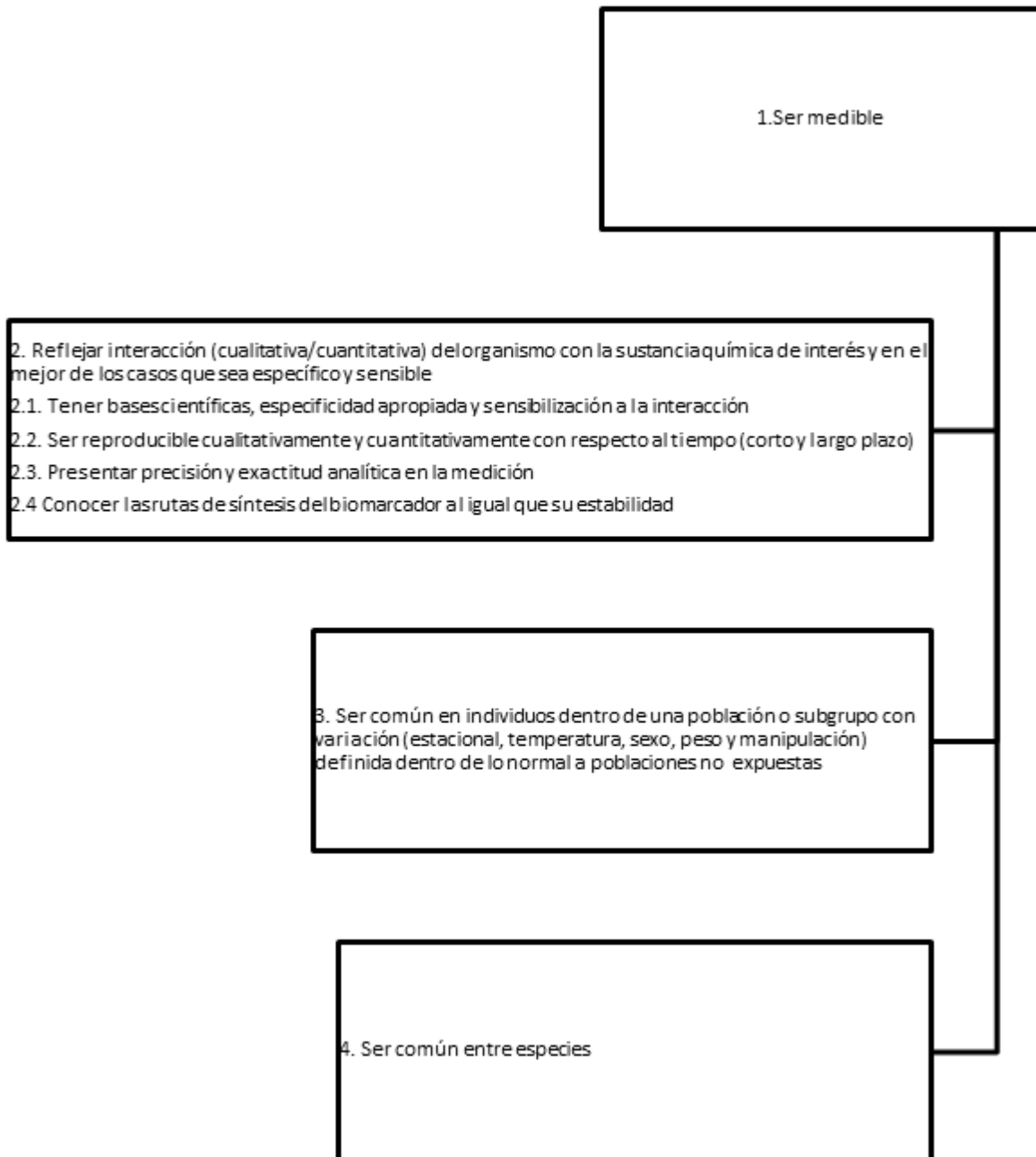


Figura 4. Características deseables de un biomarcador según WHO, 2001. (Tomado de Rendón -Von Osten, en Botello et al. (2005)).

Otra de las características que deben de considerarse para el uso y validación de los biomarcadores es la selección del organismo de medición, ya que es una etapa importante debido a que el organismo seleccionado puede presentar ventajas y desventajas que pudieran no dar resultados adecuados. Por lo tanto, se sugiere que los organismos a seleccionar estén considerados dentro de los organismos estandarizados por agencias internacionales o bien debido a características como: amplia distribución geográfica, reconocimiento documentado como especie endémica y como buen indicador de contaminación etc. (Rendón-von Ostén 2015).

Gambusia yucatanana

En las pruebas de toxicidad se recomienda que las especies a utilizar sean sensibles o centinelas. Las especies que son consideradas centinelas deben de tener una amplia distribución geográfica, ser abundantes, de fácil disponibilidad y tener tamaño suficientemente grande por conveniencia en el trabajo experimental, así como ser sensibles a la contaminación y tolerantes a un amplio intervalo de condiciones ambientales (Vanegas y Espina, en Gold Bouchot *et al.*, 2005).

De acuerdo con Rendón-von Ostén (2015), la *Gambusia yucatanana* posee potencial para su uso como bioindicador de contaminación del medio ambiente regional porque el género *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae) es el más abundante y frecuente en la ictiofauna de la Península de Yucatán. El guayacón yucateco, *G. yucatanana*, se distribuye desde Veracruz hasta Guatemala y Belice y toda la península de Yucatán, incluso en cenotes tierra adentro, aunque tiende a ser costero (figura 5).



Figura 5. Distribución de *G. yucatanana* (cuadros negros) en el centro, norte y oriente de la Península de Yucatán. Tomado de Pérez y Schmitter, 2007.

La *Gambusia yucatanana* es considerada vivípara, de talla pequeña. La talla en las hembras va de 3.5 a 8 cm y de 2.5 a 5.5 cm en los machos. Efectúa su reproducción interna mediante un órgano copular o gonopodio el cual es indispensable para la identificación de la mayoría de las especies. Esta especie nada en cardúmenes bajo la película superficial, cerca del mangle para refugiarse. Es una de las especies más eurihalina del género y existen incluso poblaciones marinas (Pérez-León y Schmitter-Soto, 2007).

Mondragón-Sánchez y Rodas-Regil (2011) mencionan que estos peces tienen poca importancia de valor económico o comercial; sin embargo, tienen características favorables para la producción de alimento vivo *para* las especies carnívoras de interés económico. Además, regula a poblaciones de otros organismos acuáticos, ya que son depredadores y la mayoría hace gran consumo de larvas de insectos.

En los peces hay órganos y tejidos principales para medir cada uno de los biomarcadores, siendo las branquias uno de los principales sitios de medición de contaminantes, debido a la osmorregulación, que es parte de los mecanismos principales en organismos acuáticos por lo que es considerado como uno de los principales sitios de ingesta de contaminantes presentes en agua, y posteriormente todo el sistema y órganos reciben el paquete del flujo sanguíneo post branquial, tales como: músculo, hígado, riñón, gónadas y cerebro. Rendón-von Ostén (2015) muestra los principales órganos y tejidos para medir en la especie *G. yucatanana* (figura 6).

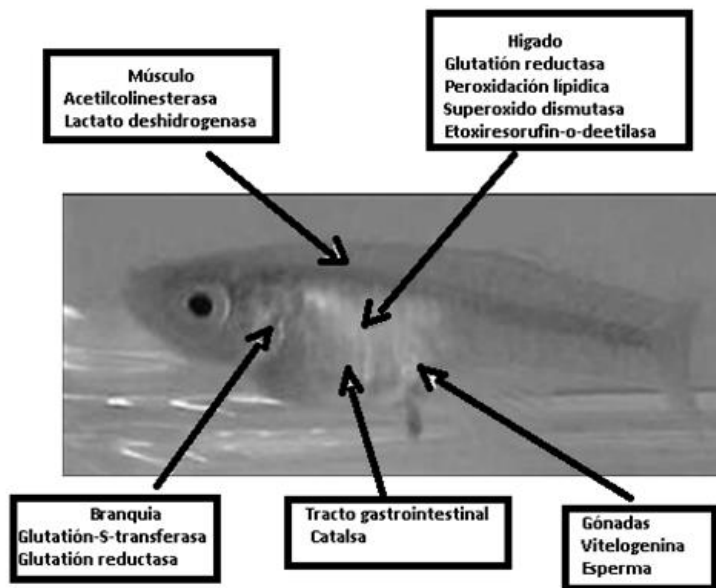


Figura 6. Principales tejidos que se utilizan para el análisis de biomarcadores en *G. yucatanana*. Tomado de Rendón-von Ostén (2015).

La *Gambusia yucatana* es uno de los peces mexicanos que ha sido utilizado en biomonitoreo y determinación de algunos biomarcadores enzimáticos con buenos resultados en ecosistemas tropicales. Las ventajas que se le atribuyen a la especie es que se encuentra ampliamente distribuida en la Península de Yucatán, así como que se ha considerado que es una especie resistente, fácil de criar y mantener (Rendón-von Ostén *et al.* 2015).

Algunos de los biomarcadores que han sido evaluados en la especie son: acetilcolinesterasa (AChE), glutatión S-transferasa (GST) y lactato deshidrogenasa (LDH) Ostén von, Ortiz-Arana, & Soares (2005). Asimismo, se han validado biomarcadores de disrupción endocrina en machos tales como la vitelogenina (Dzul, 2007) y la reducción de la cuenta espermática, índice gonadosomático (IGS) e índice gonadopodial (igp) (Chi-Uc, 2009), y otros en donde son conocidos algunos efectos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos causados por sustancias tóxicas como son los plaguicidas (Rendón-von Ostén *et al.* 2015).

CASOS DE ESTUDIO Y OTRAS HERRAMIENTAS UTILIZADAS PARA CONOCER LA CONTAMINACION POR PLAGUICIDAS EN LA ZONA NOROESTE DE YUCATAN, MEXICO

Los estudios que se han realizado con el género *Gambusia* en diversos cuerpos de agua del anillo de cenotes (zona noroeste) y en donde utilizan biomarcadores como AChE y otros para evaluar en los cenotes la presencia de plaguicidas organofosforados y organoclorados son: Evaluación temporal de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en el pez mosquito, *Gambusia yucatana* (Regan 1914), provenientes de tres cenotes de Yucatán, México de Pacheco Garrido *et al.* (2014), en Gold Bouchot *et al.*, 2014); Disrupción endocrina en *G. yucatana* por plaguicidas orgánicos persistentes en el anillo de cenotes, Yucatán por Chi *et al.* (2011, en Cobos Gasca *et al.* 2011); Plaguicidas organoclorados: Contaminantes persistentes en los cenotes de Yucatán por Cobos Gasca *et al.* (2014).

En los trabajos anteriores no sólo se ha usado a los biomarcadores como única herramienta para conocer la presencia de sustancias tóxicas, ya que otra de las herramientas utilizadas para conocer la presencia de contaminantes en diversos ecosistemas es mediante un análisis químico, empleando diferentes técnicas como cromatografía, espectrometría u otras técnicas analíticas para la detección y cuantificación de agentes contaminantes (Torres-Rodríguez y Capote-Luna, 2004) . La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o GC-MS, por sus siglas en inglés, es una técnica instrumental que comprende un cromatógrafo de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) (figura 7), a través de la cual pueden separarse, identificarse y cuantificarse mezclas complejas de compuestos químicos (Bull, 2008). Esta técnica es de amplio uso en pruebas de confirmación de las sustancias, tales como pruebas de drogas, control de calidad de fabricación y pruebas ambientales (Gutiérrez y Droguet, 2002).

La ventaja del uso de la técnica GC-MS radica en que se necesita una pequeña cantidad de muestra para su análisis, así como la identificación individual se puede realizar de una manera no muy compleja ya que, cada vez que el aparato identifica uno de los componentes, éste lo registra en forma de pico (pico cromatográfico) que se identifica mediante el espectro de masas. El espectro actúa como detector cromatográfico registrando la corriente iónica para así después identificar mediante el tiempo de retención y el ion calificador la identificación y cuantificación de los compuestos mediante curvas de calibración (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Las curvas de calibración permiten una mejor identificación, ya que en el caso de mezclas complejas el cromatograma puede presentar varios picos y algunos de ellos muy próximos de tal manera que su identificación es difícil. Por ello, es recomendable utilizar curvas de calibración ya que con ellas se pueden establecer la cantidad de componentes individuales presentes en una muestra evitando así la interferencia o errores de identificación de iones (Gutiérrez y Droguet, 2002).

INCORPORACIÓN DE LOS PLAGUCIDAS AL MEDIO AMBIENTE

Es muy conocido que los plaguicidas representan un riesgo para la salud humana y el ambiente debido a que pueden contaminar suelos, agua, sedimentos y aire. Los plaguicidas pueden llegar a los cuerpos de agua por escorrentía, infiltración, lixiviación y erosión de los suelos, en lugares donde se han aplicado o también porque pueden movilizarse por transporte atmosférico, por escurrimiento durante lluvias o por riego agrícola permitiendo que los plaguicidas puedan ser transportados hacia cuerpos de agua, tanto superficiales como subterráneos hasta contaminar agua y sedimentos (Hernández-Antonio y Hansen, 2011). Los restos de los plaguicidas que se dispersan en el ambiente se convierten en contaminantes amenazando al ecosistema. Factores como sus propiedades físicas y químicas, el clima, las condiciones geomorfológicas de los suelos y las condiciones hidrogeológicas y meteorológicas de las zonas, definen la ruta que siguen los mismos en el ambiente (del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014).

La lixiviación es un fenómeno por el cual las aguas de lluvia o del riego arrastran los nutrientes minerales de las plantas o los alejan fuera del alcance del sistema radicular (Fabreiro *et al.*, 2003). La intensidad de la lixiviación de plaguicidas y fertilizantes varía de una región a otra; sin embargo, la mayor vulnerabilidad ocurre en regiones con altas precipitaciones, en suelos principalmente arenosos y en sistemas agrícolas intensivos (Brady y Weil, 1999; Hanson y Trout, 2001; Ongley, 1997, en del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014).

La escorrentía es un proceso que ocurre principalmente debido a las precipitaciones. Se hace referencia como escorrentía a la lámina de agua que circula sobre la superficie en una cuenca de drenaje, es decir la altura en milímetros del agua de lluvia escurrida y extendida. La escorrentía superficial es una de las principales causas de erosión a nivel mundial y suele ser particularmente perjudicial en suelos poco permeables, como los arcillosos y zonas con cubierta vegetal escasa. La porción de agua que sigue cada uno de estos caminos igualmente depende de factores como el clima, el tipo de roca o la pendiente del terreno. De modo similar, en lugares en los que hay abundantes materiales sueltos o muy porosos, es muy alto el porcentaje de agua que se infiltra (EcuRed 2011).

Otra de las características que favorece que los plaguicidas se encuentren en el ambiente en forma particulada o disuelta son las características fisicoquímicas del compuesto y las características del medio como, por ejemplo, la temperatura e inclusive la humedad del suelo. La forma en que los plaguicidas pueden estar disueltos o en forma particulada en la columna de agua, así como adsorbidos en los sedimentos es importante ya que, una vez que estos llegan a encontrarse en la columna de agua son tomados por los organismos a través de sus branquias y piel durante la respiración y oralmente con la alimentación. Algunos compuestos son entonces distribuidos a través de varios órganos del cuerpo, biotransformados y parcialmente excretados. Mediante estos mecanismos de excreción o por la muerte de los organismos, los plaguicidas se incorporan al sedimento del fondo donde pueden ser resuspendidos por el movimiento de la columna de agua (Albert y Benítez, en Botello et al., 2005) (Figura 8).

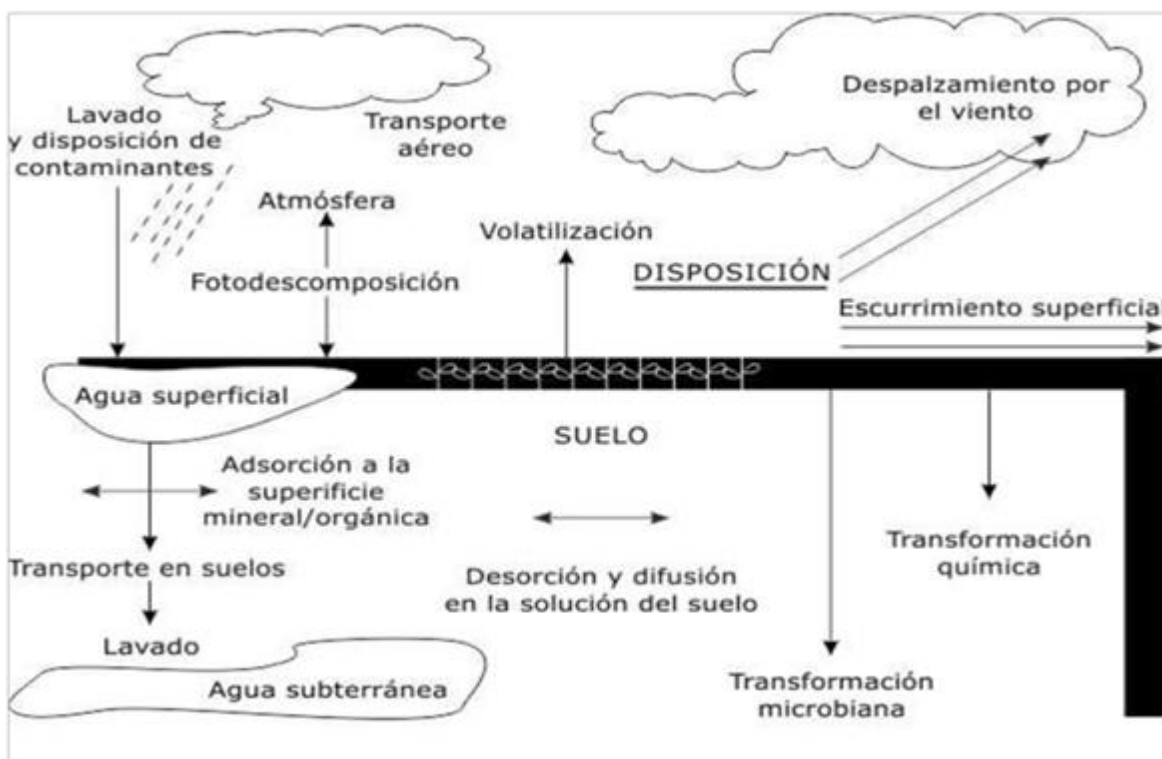


Figura 7. Introducción de los plaguicidas a la cadena alimentaria (Monterrosa 1998). Tomado del Puerto Rodríguez *et al.*, (2014).

Como se observa en la figura 8, existen una gran variedad de procesos naturales que hacen posible la presencia de sustancias tóxicas en cuerpos de agua e inclusive en el agua subterránea; sin embargo, es claro que las condiciones climáticas y la disposición de los contaminantes es diferente en cada región. Por lo cual, las características climáticas y geológicas de cada lugar hacen posible que los contaminantes presentes en el ambiente puedan afectar a diferentes compartimientos ambientales. Por ejemplo, en el caso de la Península de Yucatán que es una región con ausencia de corrientes superficiales y donde el agua de lluvia es evaporada o absorbida por plantas y suelos, el resto satura al terreno y se infiltra en el subsuelo (Pacheco-Ávila y Cabrera- Sansores, 2013), dando origen a la vulnerabilidad en la región ante contaminantes que puedan llegar a afectar diversos compartimientos ambientales e inclusive el agua subterránea, que es el único medio de abastecimiento potable. Igualmente, una de las características que se tienen en la región y que hacen posible la presencia y el comportamiento de contaminantes es la estacionalidad que se presenta, pues en el año hay tres temporadas: lluvias, secas y nortes, que pudieran definir la disposición de contaminantes en la región.

JUSTIFICACIÓN

En la península de Yucatán se realizan actividades industriales, de ganadería y agrícolas que ponen en riesgo el único medio de abastecimiento de agua potable para consumo humano que es el acuífero. Pero de estas actividades, la agricultura es muy practicada y se utilizan plaguicidas en abundancia, de manera tal que existen reportes de la presencia de estos contaminantes en el acuífero.

Como los análisis químicos en sedimentos o en agua son limitantes para determinar el efecto en los organismos que habitan un cuerpo de agua es necesario recurrir a otras herramientas, como el uso de biomarcadores que ayuden a evaluar los efectos producidos por estos contaminantes en los organismos.

Estudios han documentado el uso de *Gambusia yucatanana* como buen indicador de contaminación. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone la aplicación de un panel de biomarcadores de efecto en *G.yucatanana* silvestres y relacionarlos con los niveles de plaguicidas organoclorados en sedimento.

HIPÓTESIS

En recientes reportes se ha documentado la presencia de contaminantes, entre ellos plaguicidas organoclorados en cuerpos de agua que se encuentran a lo largo de la zona conocida como “anillo de cenotes” en Yucatán. En la zona, se ha reconocido la presencia de plaguicidas organofosforados y organoclorados, de los cuales algunos ya han sido prohibidos en muchas partes del mundo. Se espera que exista una relación entre las concentraciones de plaguicidas organoclorados medidos en sedimento con los efectos medidos en los biomarcadores actividad de acetilcolinesterasa, glutatión-S-transferasa y la concentración de glutatión total en músculo de *Gambusia yucatanana*.

OBJETIVO GENERAL

-Evaluar diferentes biomarcadores de efecto en músculo de *Gambusia yucatanana* silvestres y determinar su relación con la presencia de plaguicidas organoclorados en el sedimento de seis cenotes de Yucatán, como propuesta para manejo ambiental

OBJETIVOS PARTICULARES

-Evaluar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa presente en músculo de *Gambusia yucatanana* silvestres, como biomarcador de neurotoxicidad.

-Evaluar la concentración de Glutathion total (GHS) y la actividad de la enzima Glutathión-S-transferasa (GST) en músculo de *Gambusia yucatanana* silvestres como biomarcadores de balance redox y desintoxicación.

-Determinar si los biomarcadores evaluados presentan un efecto de talla y sexo en *G. yucatanana* silvestres.

-Medir la concentración de plaguicidas organoclorados en el sedimento de los cenotes

-Evaluar si existe una relación entre los plaguicidas organoclorados presentes en el sedimento y los biomarcadores evaluados en los peces colectados en cada cenote.

MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de sedimentos y organismos silvestres de *Gambusia* y. fue realizada en mayo de 2014 en época de secas en 6 cenotes ubicados dentro del anillo de cenotes (Tabla 1 /Fig. 9). El muestreo fue realizado solo en época de secas debido a que el primer muestreo en el proyecto UNAM-PAPIIT-DGAPA IA200214 fue propuesto durante este mes que es parte de la época de secas. Los organismos fueron colectados con ayuda de una red de acuario y fueron colocados en bolsas de cierre hermético con aireación y se llevaron al Laboratorio de Ciencias Ambientales Costeras de la Unidad de Química Sisal de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. En total se recolectaron 38 organismos. Una vez que los organismos se llevaron al laboratorio a estos se les dio un choque térmico y se tomaron datos morfológicos (Largo total, largo patrón y ancho). En todos los organismos fueron tomados el cerebro y musculo, el primero fue tomado por una colega como parte del análisis del proyecto y para este trabajo fue tomado el músculo. El músculo fue colocado en hielo durante su procesamiento. Los homogeneizados se prepararon con una concentración de 75 mg de tejido por cada mililitro del buffer. Una vez colocado el buffer Tris pH 7.4 0.05 M de acuerdo al peso de la muestra, se utilizó un homogeneizador con pistón de teflón hasta que el tejido quedó completamente homogeneizado, cabe destacar que el contenedor de tejido/buffer se mantuvo en hielo en todo momento para conservar la muestra. Una fracción del homogeneizado fue congelada para GSH. Para AChE y GST el homogeneizado obtenido se centrifugó a 10000 x g por 5 minutos y se separó el sobrenadante para su posterior análisis. Posterior a su homogenización, todos los tubos fueron congelados a -80°C hasta su análisis (Figura 8). El periodo de este análisis fue del 6 de febrero al 11 de marzo de 2015.

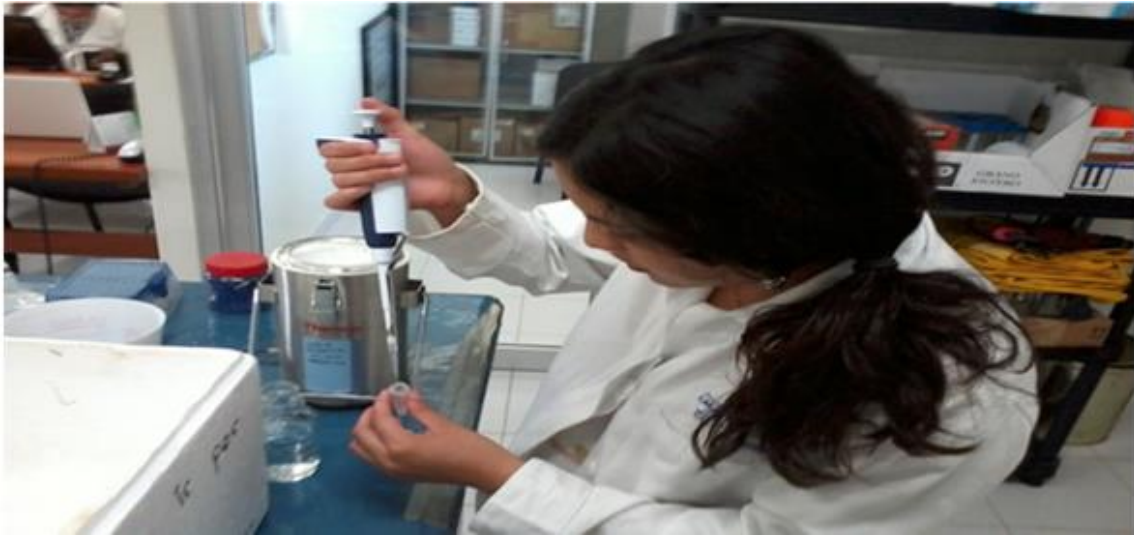


Figura 8. Preparación de las muestras de musculo en *G. yucatan*

En cada sitio fue colectada una muestra de sedimento, las cuales fueron colectadas lo más céntrico posible del cenote a mano utilizando una pala pequeña con cubierta de teflón. Las muestras fueron colocadas en bolsas con cierre hermético y colocadas en hieleras hasta su llegada al laboratorio.

Las muestras de sedimento fueron analizadas en el Laboratorio de Ciencias Ambientales Costeras de la Unidad de Química Sisal de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se liofilizaron y posteriormente se tamizaron con el tamiz de 500 μm . La determinación de plaguicidas organoclorados en los sedimentos se realizó con base en métodos recomendados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos o EPA (Método 1699 (EPA, 2017), Método 3550C (EPA 2007), Método 8250A (EPA, 1994), Método 8270D (EPA 2007)), los cuales fueron modificados para acoplarse a los materiales y equipos disponibles en el laboratorio. El periodo en que se realizó el análisis en el laboratorio fue durante el 24 de febrero al 8 de marzo del 2016.

Tabla 1. Sitios de muestreo

SITIOS DE MUESTREO	DE	CLAVE	COORDENADAS	MACHOS	HEMBRAS	TIPO DE CENOTE
Tetiz		E4	N 20° 57' 35.4" O 89° 55' 49.6"	3	2	
Carretera kinchil-Sinkeuel		E6	N 20° 48' 47.9" O 90° 11' 46.8"	3	3	Cenote abierto
Yaxcopoil		E10	N 20° 44' 11.3" O 89° 43' 55.4"	6	1	Cenote cerrado
Pixyah		E13	N 20° 38' 47.4" O 89° 24' 16.6"	3	6	Cenote cerrado
Homun		E19	N 20° 43' 37.2" O 89° 16' 05.3"	3	1	Cenote semi abierto
Santo Domingo- Buctzotz		E22	N 21°08'54.2" O 88°39'28.2"	6	1	Cenote abierto



Figura 9. Zona de estudio. Mapa tomado de Google earth TM y editado en ArcMap™

Metodologías utilizadas para cada biomarcador:

Acetilcolinesterasa:

Este método consiste en una determinación espectrofotométrica sencilla y rápida en la cual se utiliza a acetilcolina como sustrato y se valora la tiocolina liberada por la intensidad de color amarillo aparecida al reaccionar esta sustancia con ditiobisnitrobenzoato. En este trabajo, para la determinación de colinesterasas se siguió el método de Ellman (1961), modificado por Rodríguez-Fuentes G. *et al.* (2008). Este procedimiento consistió en descongelar los tubos y colocar 20 μL de muestra en micro placas por triplicado, posteriormente se agregaron 170 μL de DTNB/TRIS pH 7.4 como buffer y agente formador de color en cada uno de los pozos, inmediatamente antes de iniciar la lectura de la cinética enzimática se agregaron 10 μL ASChI 1 mM en cada pozo de la placa. La absorbancia fue medida a 450nm por 120 segundos.

Los datos obtenidos se normalizaron con respecto a su contenido de proteína que se hizo por el método de Bradford *et al.* (1976). La actividad se calculó usando la formula siguiente y los datos fueron presentados en nmol/min/mg de proteína.

Cálculo de la actividad de colinesterasas:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{1}{10000} * \frac{\Delta A / \text{min}}{(V_h / V_t) * C_p} * 1000000$$

nmoles/ min/mg proteína

Donde:

$\Delta A / \text{min}$ = cambio de absorbancia en el tiempo (se obtiene de la cinética)

V_h / V_t = Volumen del homogeneizado/ volumen total de reacción = 20 μL /200 μL

C_p = Concentración de proteína mg/ml

Glutación-S-transferasa (GST):

Para la determinación de Glutacion S-transferasa (GST) se utilizó un kit de Sigma-Aldrich (número de catálogo CS0410). El kit de Glutacion S-transferasa está destinado a medir la actividad total de GST. Este kit es utilizado para medir la actividad de GST en tejido homogéneo en plasma, tejido y sangre. Se utiliza debido a que es un ensayo rápido y simple de medir.

Para la determinación de GST los tubos previamente guardados se descongelaron a temperatura ambiente. Se tomaron 20µL de muestra que fueron colocados en microplacas por triplicado y una vez que la muestra estaba lista en el lector de placas se agregaron 170µL de Buffer de Fosfatos salino pH 7.5 50 mM (19.6 mL) + GSH 200 mM (200µL) + CDNB 100 Mm (200µL). Se midió el cambio de absorbancia a 340 nm utilizando el modo de cinética durante 12 minutos.

La actividad de GST fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\frac{(\Delta A_{340}) / \text{min} \times V(\text{ml}) \times \text{dil}}{\epsilon_{mM} \times V_{enz}(\text{ml})} = \mu\text{mol} / \text{ml} / \text{min}$$

Donde:

dil= factor de dilución de la muestra original

ϵ_{mM} (mM⁻¹cm.⁻¹) – el coeficiente de extinción por CDNB conjugado a 340nm.

- Para pruebas con placa de 96 pozos 9.6 mM⁻¹ (longitud de la trayectoria 1 cm)
V- volumen de la reacción
- Para pruebas en placas de 96 pozos= 0.2ml V_{enz} -el volumen de la muestra

Glutación Total (GSH):

Para la determinación de glutación total fue utilizado un kit de Sigma-Aldrich (número de catálogo CS0260). El kit cuenta con reactivos necesarios para el ensayo, es rápido y simple para medir el nivel de glutación total. En general, el método consiste en desproteínizar la muestra con la solución de ácido 5-sulfosalicílico al 5%. El contenido de glutación en la muestra se conoce utilizando cinética, en la que cantidades catalíticas de glutación que causan una reducción continua de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) a TNB. El glutación oxidado formado se recicla por el glutación reductasa y el NADPH. El producto TNB se lee a 405 nm Sigma-Aldrich (2016).

Las muestras se descongelaron y en nuevos tubos de centrifuga se colocaron 200µL de muestra, y posteriormente se agregó 200µL de Ácido Sulfosalicílico (SSA) centrifugando a 10,000xg por 5 minutos. Una vez que éstas se centrifugaron, en micro placas se colocaron 20µL del sobrenadante por triplicado. Después la micro placa se llevó al lector y antes de iniciar la reacción se agregaron 50µL de NADPH (40 mg/ml) y se leyó a 405 nm por dos minutos con intervalos de 17 segundos. Para calcular los valores de GSH se usaron los valores de la solución estándar de Glutación que se terminó con una curva estándar (0-50 µM). Calculo de nmoles de GSH en la muestra:

$$\begin{array}{l} \text{nmoles GSH} \\ \text{per ml of} \\ \text{sample} \end{array} = \frac{\Delta A_{412}/\text{min}(\text{sample}) \times \text{dil}}{\Delta A_{412}/\text{min}(1 \text{ nmole}) \times \text{vol}}$$

Donde:

$\Delta A_{412}/\text{min}(\text{muestra})$ = pendiente generada por la muestra (después de restar los valores generados por la reacción blanco)

$\Delta A_{412}/\text{min}(1 \text{ nmole})$ = pendiente calculada con la curva estándar por 1nmol de GSH

dil = factor de dilución de la muestra original

vol = volumen utilizado de homogeneizado

Análisis de plaguicidas en sedimentos

El análisis de plaguicidas en sedimentos se inició con un procedimiento de extracción asistida por ultrasonido (USE) para extraer los compuestos orgánicos presentes en cada muestra. El procedimiento consistió primeramente en pesar 2 g de cada una de las muestras de sedimento previamente liofilizados y colocarlos en viales de vidrio de 40 mL. Una vez pesadas las muestras, se les agregaron 12 mL de Hexano/Acetona (1:1, v: v) y se realizó la USE durante 2 minutos con 70% de energía empleando un procesador ultrasónico marca Cole Parmer®. Durante el procedimiento de extracción el vial se mantuvo sumergido en agua fría, para evitar el calentamiento del extracto. Posteriormente el extracto fue separado de los residuos sólidos de la muestra por centrifugación (5000 rpm, durante 10 min). Ya que se sacaron las muestras de la centrifuga, cada una de las muestras se pasó nuevamente a viales de 15 mL y cuando se terminaba de pasar cada muestra a cada vial se le hizo un lavado 3 veces con Hexano/Acetona (1:1, v: v) y, finalmente, la muestra se evaporó a sequedad con una corriente suave de nitrógeno (N₂) dejando 0.75 mL de extracto (figura 10).

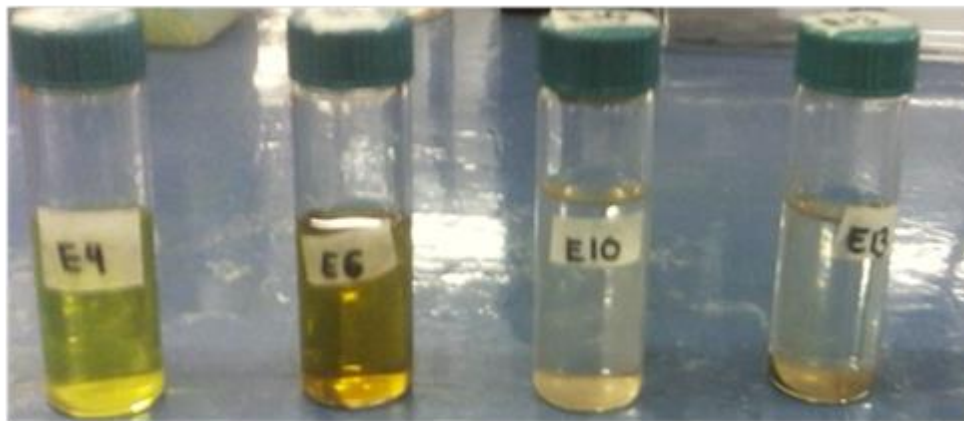


Figura 10. Muestras de sedimentos después de haber sacado de centrifuga

Una vez finalizada la USE, se realizó una limpieza de los extractos por extracción en fase sólida (EFS), empleando cartuchos Strata X 33µm de 500 mg/6 mL (Phenomenex, 8B-S100-HCH), los cuales contienen un polímero modificado con N-vinil-pirrolidona. Para la EFS, los cartuchos debidamente etiquetados se colocaron en un Manifold para EFS de 10 posiciones (Phenomenex AH0-7502), donde fueron acondicionados con 10 mL de hexano (pasados a través de cada cartucho por gravedad), para preparar el adsorbente para tener un mejor contacto con las muestras (extractos) (Figura 12).

Ya acondicionados los cartuchos, se procedió a colocar viales de vidrio de 22 mL que contenían 1.5 g de sulfato de sodio anhidro debajo de cada cartucho, para recibir los extractos ya purificados. Una vez armado el sistema, se agregó la muestra (0.75 mL de extracto) y se pasó por el cartucho a través de goteo constante y cuando éstos estaban a punto de secarse, se realizó un lavado del vial 2 veces colocando en cada lavado 500 μ L de hexano/acetona (9:1, v: v) (figura 13). El desplazamiento de los analitos se realizó agregando 15 mL de hexano-acetona (9:1, v: v) recolectando el extracto en los viales de 22 mL. Después se evaporó el disolvente hasta 0.75 mL aproximadamente, con una corriente suave de nitrógeno (N_2) y se transfirió a un vial de 7 mL que fue lavado tres veces con hexano/acetona (9:1, v: v) y se evaporó el disolvente hasta 0.5 mL aproximadamente, con una corriente suave de nitrógeno (N_2) y finalmente las muestras fueron colocadas en viales ABC ámbar de 2 mL. Los viales fueron guardados en refrigeración para la identificación y cuantificación por CG-EM.

Los plaguicidas se identificaron y cuantificaron por CG-EM. Cada muestra fue evaporada con una corriente suave de nitrógeno y se inyectó por medio del automuestreador en el cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, equipado con una columna Zebron ZB-5MSi de Phenomenex de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de grosor de película (Imagen 2222). En la tabla 1 se presenta el listado de plaguicidas individuales que fueron considerados en este estudio, así como el tiempo de retención que presentan en las condiciones cromatográficas seleccionadas y los iones considerados para el monitoreo selectivo de iones (Modo SIM).



Figura. 11. Cromatógrafo de Gases para análisis de muestras de sedimentos en Laboratorio de Química UNAM Sisal.

Tabla 2. Iones seleccionados para la operación en modo SIM para la identificación y cuantificación de cada compuesto.

Compuesto	Tiempo de retención (Minutos)	Ión calificador (m/z)
α -HCH	16.214	221
β -HCH	17.176	221
γ -HCH (Lindano)	17.335	221
δ -HCH	18.321	221
Heptacloro	20.330	274
Aldrín	22.083	265
Heptacloroepóxido (isómero β)	24.433	265
Trans-clordano	25.992	265
β Endosulfan(Endosulfan1)	26.771	265
Cis-clordano	27.027	265
Dieldrin	28.683	265
4, 4'-DDE	28.963	248
Endrín	30.302	265
β -Endosulfan(EndosulfanII)	31.045	263
4, 4'-DDD	31.995	237
Endrinaldehído	32.275	265
Endosulfánulfato	33.663	263
4, 4'-DDT	34.102	237
Endrincetona	35.831	250
Metoxicloro	36.951	228
Clorpirifos	22.692	316

Para la identificación positiva de cada compuesto en las muestras se tomaron los siguientes criterios: 1) que coincidieran los tiempos de retención del ion calificador con el tiempo de retención observado en los estándares y 2) que coincidirán la razón de los iones con la razón observada en los estándares.

La concentración de los plaguicidas se calculó con base a en una curva de calibración (Tabla 2) realizada con soluciones fortificadas que contenían los plaguicidas de interés en diferente concentración y a las que se les dio el mismo tratamiento analítico que a las muestras. Se utilizó el programa Excel para el análisis de los datos generados.

Tabla 3. Preparación de curva de Calibración

Curva	Plag OC+ CPF 5µg/ml
Etiqueta de vial	µg
1	2
2	10
3	15
4	20
5	100
6	200
7	400
8	1000

Respuesta Integrada de Biomarcadores (IBR)

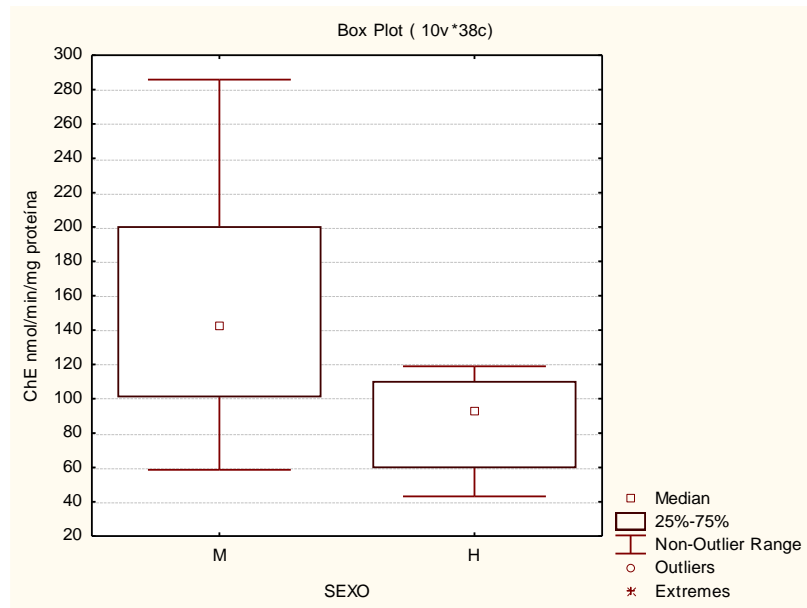
Los resultados de esta sección fueron analizados usando el método de la integración de Respuestas de Biomarcadores de Beliaeff & Burgeot (2001). En este método las respuestas son estandarizadas en un índice de estrés general y es aplicado para evaluar el efecto de sexo en cuerpos de agua de la zona anillo de cenotes. Los análisis de datos se encuentran a detalle en Li *et al.*, 2016. Los datos fueron calculados con la media y (SD) desviación estándar, y fueron estandarizados de acuerdo a la formula $Y = (X - m) / S$, donde Y es la estandarización de datos, X es la respuesta de cada biomarcador, m es la media del dato del biomarcador, y S es la desviación estándar del biomarcador. Los valores de Z fueron calculados como $Z = Y$ en el caso de activación y $Z = -Y$ en el caso de inhibición. El valor minimo fue obtenido (Min) y S fue calculado como $S = Z + |\text{Min}|$, donde $S \geq 0$ y $|\text{Min}|$ es el valor absoluto. El cálculo de las áreas de los gráficos de estrella (A_i) fueron calculados con la fórmula: $A_i = S_i / 2 \sin \beta (S_i \cos \beta + S_{i+1} \sin \beta)$, donde $\beta = \text{Arc tan} (S_{i+1} \sin \alpha / S_i - S_{i+1} \cos \alpha)$, α es $2\pi/n$ radianes, y S_i es obtenido del valor de cada biomarcador. La suma de la superficie de A_i corresponde al valor de IBR; $IBR = \sum_{i=1}^n A_i$, n es el número de biomarcadores.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el anexo 1 se encuentran los datos obtenidos en *G.yucatana* que fueron utilizados para la realización de las pruebas estadísticas. Como se observa en el anexo los datos para todos los parámetros de interés probaron ser no normales, por lo anterior la estadística utilizada es no paramétrica.

El primer análisis estadístico que se realizó fue una prueba U de Mann Whitney, para conocer si había diferencias entre sexos de cada biomarcador medido; AChE, GST y GSH. El segundo análisis estadístico que se realizó fue una correlación (Spearman) con los datos morfológicos; largo total, largo patrón y ancho con cada biomarcador medido en *G.yucatana* tanto en hembras como en machos. Y, por último, se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis para observar si había diferencias entre cada sitio de muestreo y cada biomarcador medido tanto en hembras como en machos. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATISTICA®.

De acuerdo a los resultados del primer análisis estadístico, para el caso del biomarcador AChE se observó que los valores fueron significativamente diferentes, con un valor de $p < 0.05$, presentándose menor actividad en hembras (Gráfico 1).

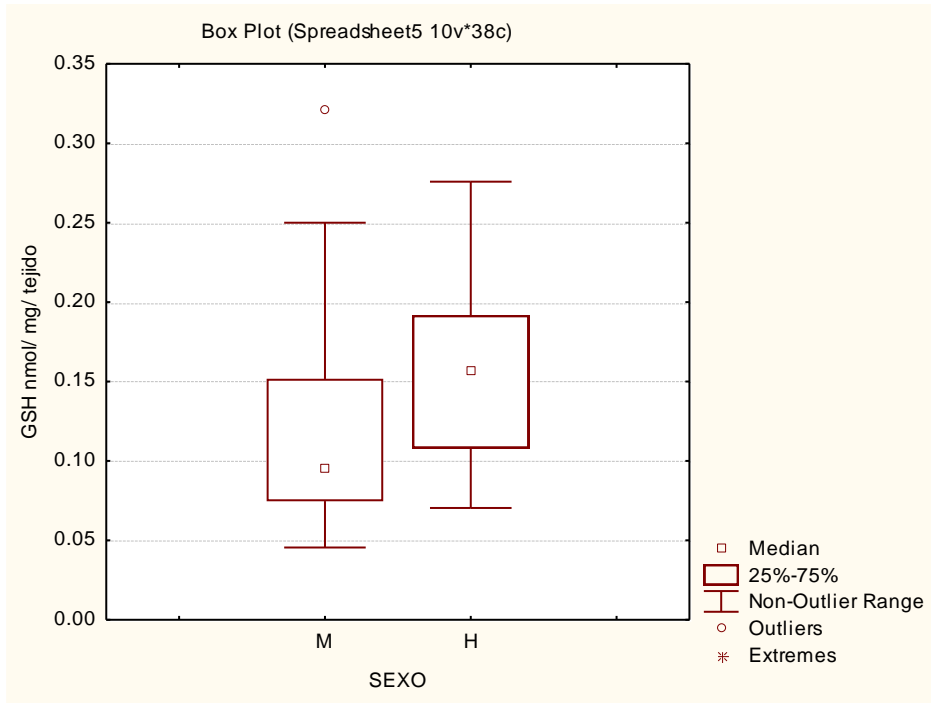


Gráfica 1. Actividad enzimática promedio de la enzima AChE en *G. yucatanana*

La actividad enzimática AChE ya ha sido medida anteriormente en la especie *Gambusia yucatanana* Pacheco Garrido *et al.*, (2014). El estudio fue realizado en cerebro y los resultados fueron relacionados con el sexo y entre localidades, las localidades se encuentran a lo largo de la zona anillo de cenotes. Los organismos se obtuvieron en época de lluvias y secas. En la época de lluvias no se detectaron efectos significativos en la interacción de sexo y actividad de AChE, solo detectaron diferencias para la localidad, ya que las actividades enzimáticas promedio fueron significativamente diferentes entre los individuos de las localidades de Celestún y Abalá, siendo Celestún la localidad donde se registraron actividades promedio más bajas. En la época de secas no se detectó ningún efecto significativo entre localidades, solo se observó que en la localidad de Celestún la actividad enzimática fue ligeramente mayor en las hembras, lo cual es diferente a lo que se encontró en esta tesis, donde las actividades promedio fueron significativamente más bajas en hembras que en machos. Se ha reportado que las diferencias en la actividad de AChE y el sexo es diferente entre especies. Por ejemplo, se ha reportado que la actividad de la ChE no presenta diferencias entre sexos en el lenguado, *Pleuronectes vetulus*, sin embargo, otras especies como la del lenguado (*Pleuronychtis verticalis*) si presenta un efecto del sexo, con una actividad más alta en las hembras (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2008).

Con respecto a la talla, existe el reporte de no encontrar diferencias significativas de la actividad enzimática promedio de AChE entre tallas (Pacheco Garrido *et al.*, 2014), lo cual concuerda con lo obtenido en el presente trabajo. Sin embargo, difiere con lo encontrado en otras especies, como en *Leusiscus cephalus* Flammarion *et al.*, (2002) y *Oreochromis niloticus* Rodríguez-Fuentes *et al.*, (2016) donde la talla se debe considerar al interpretar los datos de actividad de AChE.

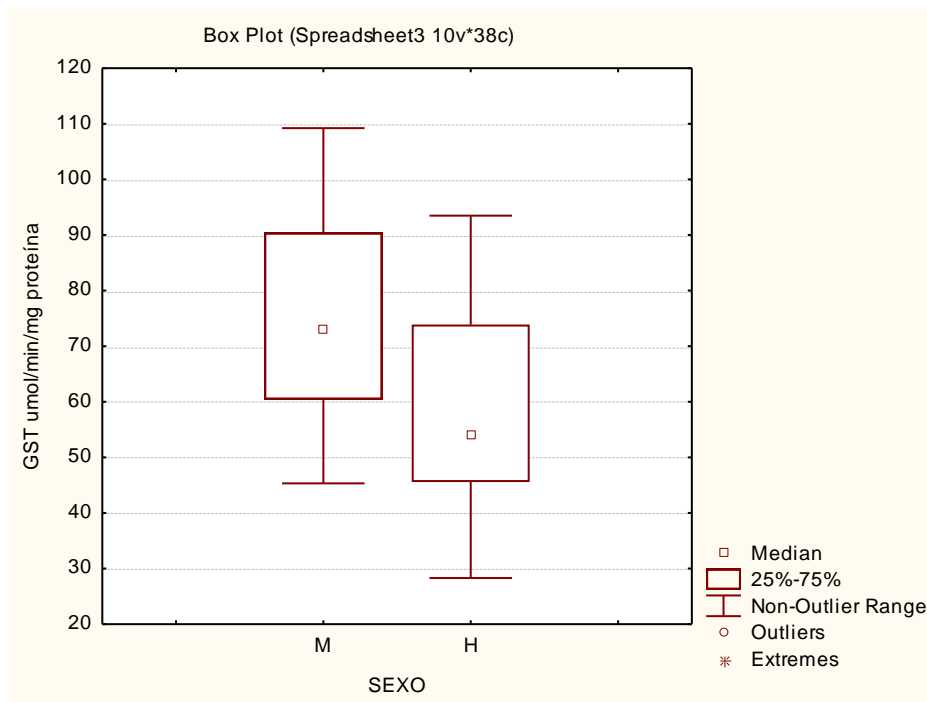
En el caso del análisis estadístico de la concentración de GSH se observó una actividad promedio mayor en hembras que en machos, con un valor de $p=0.0084$ (Gráfica 2). En el caso de la correlación de datos morfométricos con la actividad de GSH no fueron significativos ni presentaron linealidad (Tablas 3 y 4).



Gráfica 2. Actividad enzimática promedio de glutatión en *G. yucatanana*

Para el caso de este biomarcador no se encontró alguna información sobre el efecto en talla o sexo con la concentración de *GSH* en *G. yucatanana* u otras especies de peces.

En cuanto al análisis estadístico de la actividad de GST se observó que la actividad enzimática promedio fue significativamente mayor en machos que en hembras, con un valor de $p=0.0231$ (Gráfica 3). En la correlación de datos morfométricos con la actividad de GST no fue significativa ni presentó linealidad (Tablas 4 y 5).



Gráfica 3. Actividad enzimática promedio de glutatión S-transferasa en *G. Yucatanana*

Existen algunos reportes como el de Argota y González (2013) donde se utilizó a *G. punctata* de la familia *Poeciliidae* para medir la actividad GST en hígado. El muestreo se realizó trimestralmente en el año 2011 en Santiago de Cuba en tres estaciones de muestreo pertenecientes a las partes alta, media y baja tanto del ecosistema San Juan y File, en donde uno (San Juan), fue considerado como un ecosistema crítico según la exposición al número de fuentes y la limnología del sistema. Los resultados indicaron que la actividad de GST fue diferente entre sexos, siendo la actividad promedio más alta en hembras (164.33 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) que en machos (162.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), en concordancia a lo encontrado en el presente trabajo. Se presentaron mayores actividades promedio en el sitio de San Juan, sitio donde se reconoció encontrar mayores fuentes de contaminación.

En el caso de la correlación de datos como la talla y la actividad de GST, se encontró el trabajo de Carvalho-Neta *et al.* (2013) en el que se reporta que se midió la actividad de GST en el hígado de bagre *Sciades herzbergii* para evaluar los efectos bioquímicos de los contaminantes en dos terminales marinas de Brasil, uno en la isla de São Luís conocido como un sitio contaminado y con un alto impacto antropogénico y un sitio no contaminado, que es la isla de Caranguejos. Este estudio se llevó a cabo en dos épocas: lluvias y secas (agosto 2010 a abril de 2011). Los datos obtenidos en los peces fueron: peso, longitud, estado gonadal (madurez sexual) e índice gonadosomático. Los datos fueron utilizados para generar modelos estadísticos lineales y no lineales para analizar la dependencia entre la actividad de la enzima en peces colectados en los dos sitios. En las comparaciones solo se obtuvieron diferencias significativas de la actividad de GST en peces colectados en el área contaminada que en aquellos colectados en el sitio de referencia. El peso, longitud, estados de madurez sexual y el índice gonadosomático fueron significativos en el modelo lineal de actividad de la GST en el sitio no contaminado. Los autores mencionan que el resultado de los patrones de actividad enzimática aumenta con la madurez sexual de los peces en ambientes saludables y en el área contaminada donde no se obtuvieron correlaciones probablemente sea resultado de la energía usada en la biotransformación de los contaminantes.

Tabla 4. Análisis de Spearman para correlación de las de actividades enzimáticas AChE y GST, y concentración de GSH en machos con datos morfométricos (largo tota, largo patrón ancho)

MACHOS	N	Spearman R	t(N-2)	p-level
AChE-LT	24	-0.39	-1.99	0.05
AChE-LP	24	-0.39	-1.99	0.05
AChE-A	24	-0.39	-1.99	0.05
GST-LP	24	0.35	1.78	0.08
GST-LT	24	0.35	1.78	0.08
GST-A	24	0.35	1.78	0.08
GSH-LT	24	-0.10	-0.51	0.60
GSH-LP	24	-0.10	-0.51	0.60
GSH-A	24	-0.10	-0.51	0.60

Tabla 5. Análisis de Spearman para correlación de las de actividades enzimáticas AChE y GST, y concentración de GSH en hembras con datos morfométricos (largo tota, largo patrón ancho)

HEMBRAS	N	Spearman R	t(N-2)	p-level
AChE-LT	14	-0.46	-1.81	0.09
AChE-LP	14	-0.34	-1.26	0.23
AChE-A	14	-0.46	-1.80	0.09
GST-LP	14	0.30	1.10	0.29
GST-LT	14	0.33	1.23	0.23
GST-A	14	0.52	2.14	0.05
GSH-LT	14	0.20	0.73	0.47
GSH-LP	14	0.15	0.55	0.59
GSH-A	14	-0.02	-0.07	0.94

Al evaluar la respuesta de los biomarcadores en los diferentes sitios muestrados, se observó que la actividad de AChE por estación no presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) ni en los machos ni en las hembras. Igualmente, en el caso de la actividad de GSH y de la concentración de GST por sitios, tanto en hembras como en machos no se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) (fig. 12, 13 y 14) (Tabla 5).

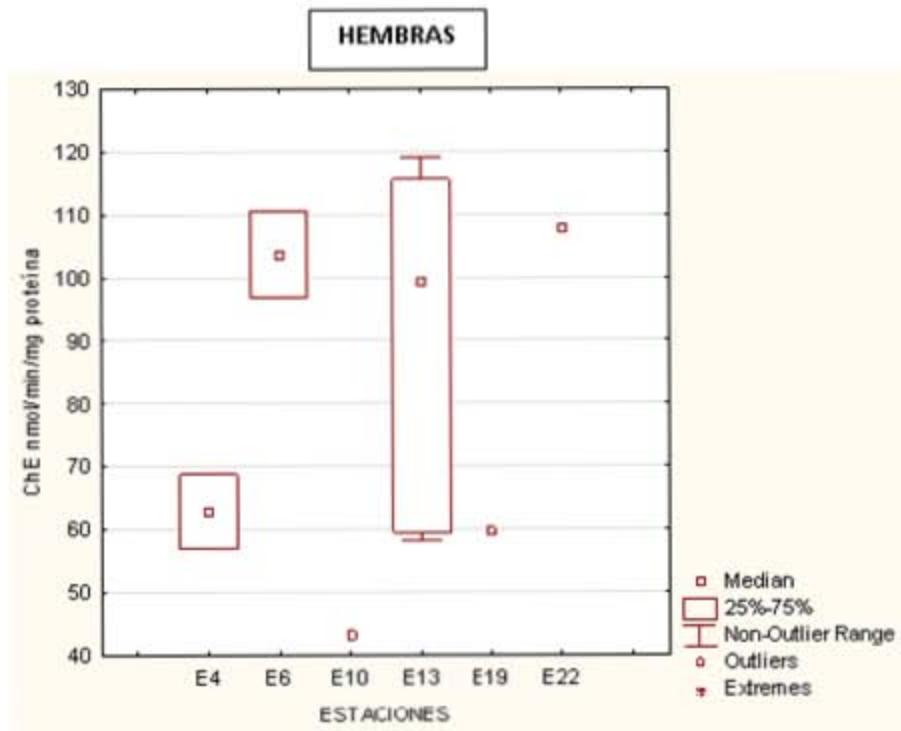
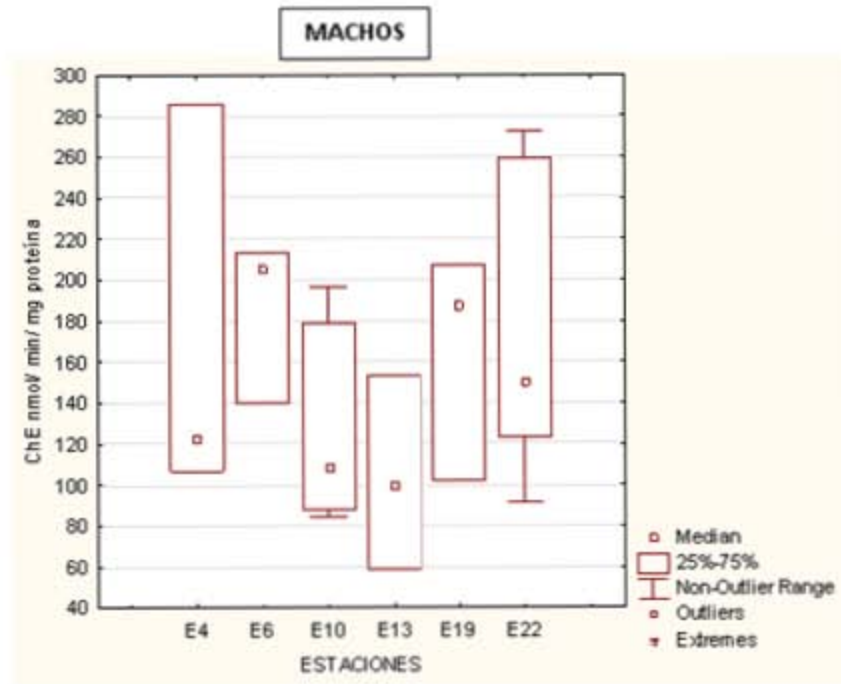


Fig.12. Actividades enzimáticas promedio de AChE en machos y hembras de *G. yucatanana* por estación

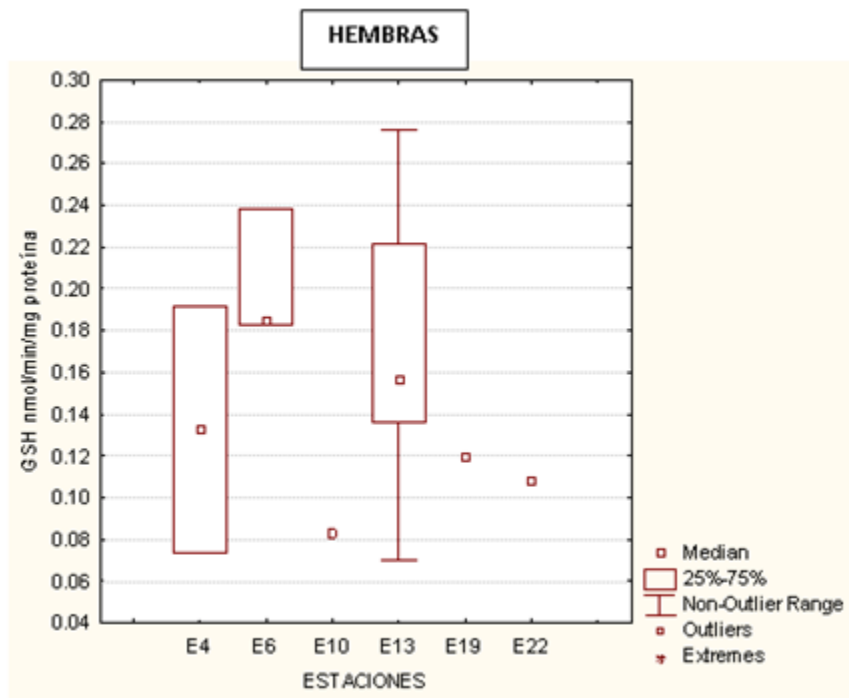
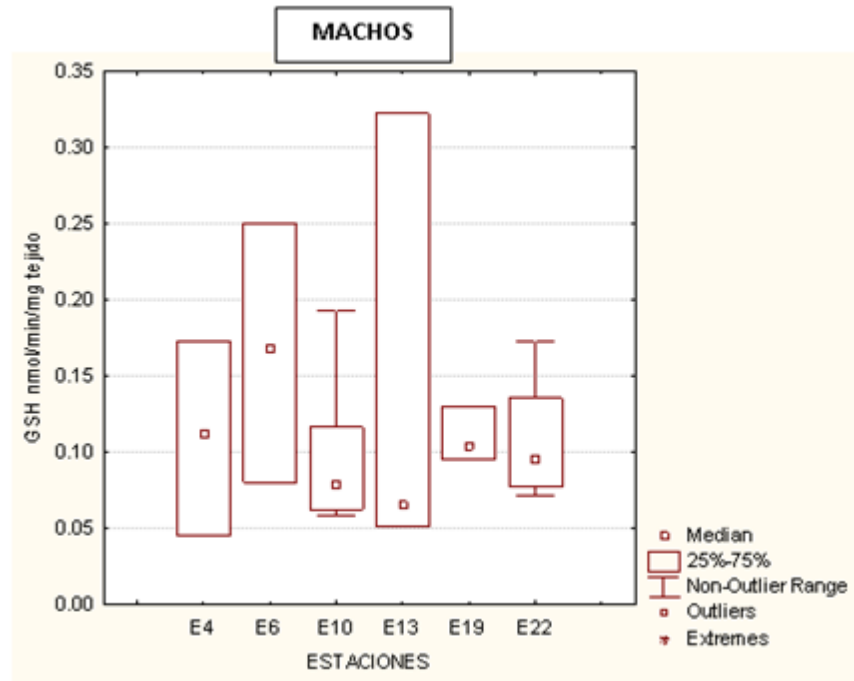


Fig. 13. Actividades enzimáticas promedio de GSH en hembras y machos de *G. yucata* por estaciones

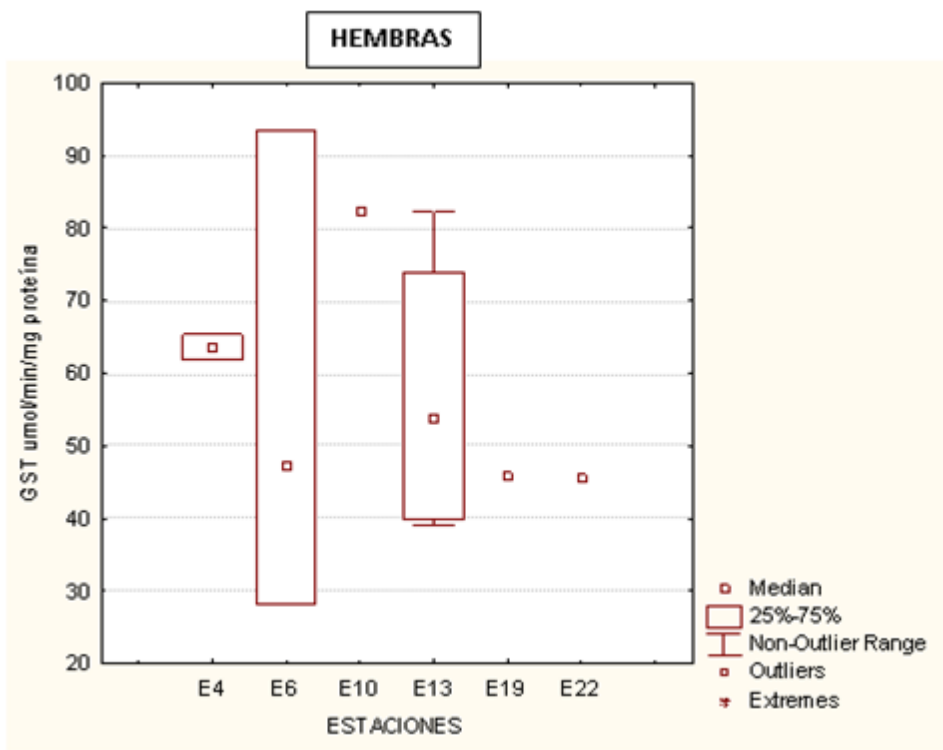
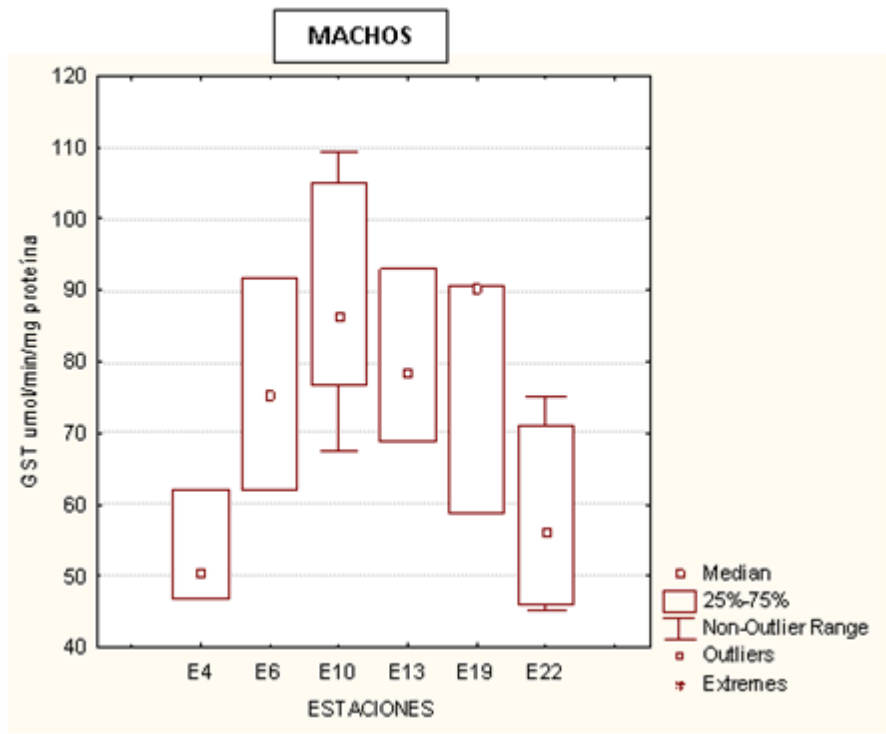


Fig.14. Actividades enzimáticas promedio de GST en hembras y machos de *G. yucatan* por estaciones

Tabla. 6. Kruskal Wallis. Actividades enzimáticas y actividad promedio de machos en *G. yucatanana*

por estación					
MACHOS	N	Mediana	Kruskal Wallis	df	p
AChE	24	142.6	5.39	5	.36
GST	24	73	12.18	5	.32
GSH	24	.095	2.38	5	.79
HEMBRAS	N	Mediana	Kruskal Wallis	df	p
AChE	14	92.5	6.25	5	.39
GST	14	53.9	2.75	5	.83
GSH	14	.156	6.44	5	.37

Los datos de concentración de plaguicidas (ng/g) en los sedimentos por estación de muestreo fueron graficados y se presentan en las figuras 7, 8 y 9. Para facilitar el análisis de resultados, los 20 analitos individuales analizados se agruparon de acuerdo a sus similitudes químicas. En total se consideraron 8 grupos (formados por la sumatoria de las concentraciones de varios compuestos o por un compuesto individual):

- a) CLORDANOS: sumatoria de heptacloro, epóxido de heptacloro, trans-clordano y cis-clordano.
- b) ENDOSULFÁN: sumatoria de α -endosulfán, β -endosulfán y sulfato de endosulfán.
- c) DDT's: sumatoria de 4,4'-DDE, 4,4'-DDD y 4,4'-DDT.
- d) DRINES: sumatoria de aldrín, dieldrín, endrín, endrín cetona y endrín aldehído.
- e) HCH's: sumatoria de α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH
- f) CLORPIRIFOS
- g) METOXICLORO
- h) PLAGUICIDAS TOTALES: sumatoria de todos los plaguicidas individuales.

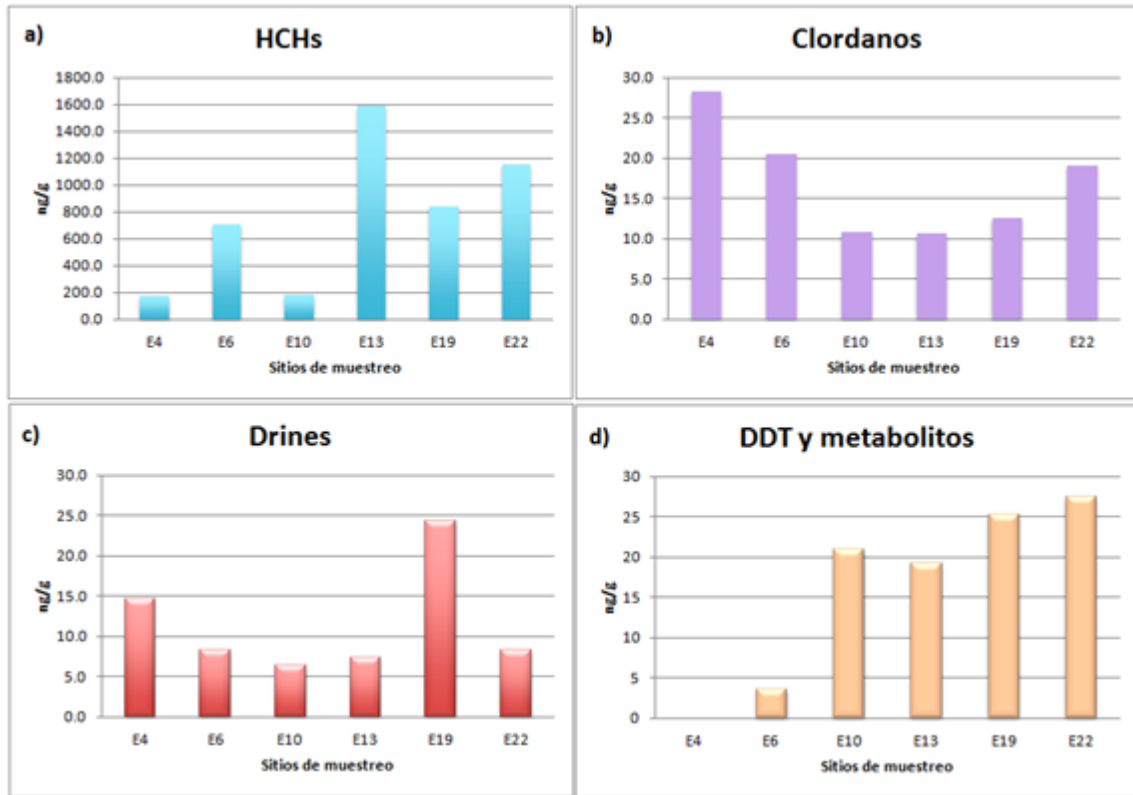


Figura 15. Concentraciones de plaguicidas encontradas en sedimento de: HCHs, Clordanos, Drines y ddt y metabolitos en cada estación de muestreo

En la figura 15 en a, b, c y d se observa que la concentración de HCHs encontradas en las muestras de sedimento son más altas en las estaciones E13, E22 y E19, con concentraciones de 838 a 1596 ng/g. En la gráfica b se observa que las concentraciones más altas en comparación con las demás se estaciones, en las estaciones E4, E6 y E22 se obtuvieron concentraciones de 19 a 28 ng/g. En el caso del grupo de drines se observó que las concentraciones más altas están en las estaciones E19 y E4 con concentraciones de 14 a 24 ng/g. En la gráfica d se observa que las mayores concentraciones se encontraron en las muestras de sedimentos de la estación E22, E19, E10 y E13 con concentraciones que van de 19 a 27 ng/g.

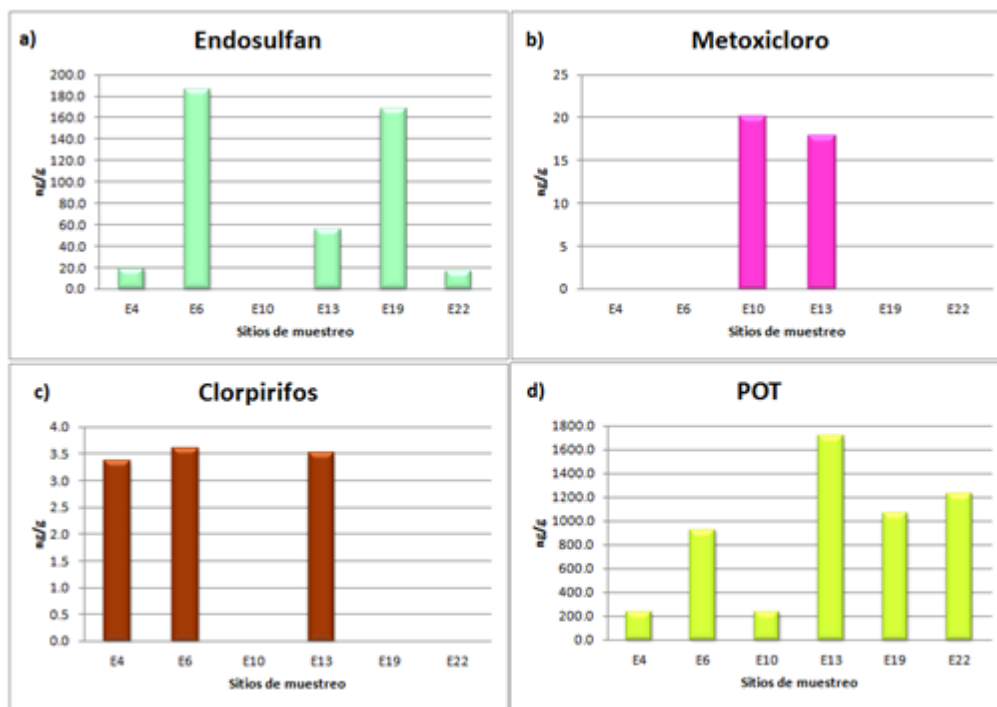


Figura 16. Concentración de plaguicidas encontradas en sedimento de: **Endosulfan, Metoxicloro, Clorpirifos y Plaguicidas Organoclorados totales** en cada estación de muestreo

En la figura 1888 en la gráfica a se observó que en las estaciones E6 y E19 se obtuvieron concentraciones de hasta 168 a 186 ng/g. En el caso de la gráfica b las concentraciones más altas se obtuvieron en las estaciones E10 y E13 con concentraciones de 17 a 20 ng/g. En el caso del compuesto clorpirifos (gráfica c), las concentraciones más altas se observaron en las muestras de sedimento de las estaciones E6, E13 y E4 con concentraciones que van de 3.37 a 3.60 ng/g. Por último, en la gráfica d, (plaguicidas organoclorados totales) fueron incluidos todos los grupos de los plaguicidas medidos en cada estación y en la gráfica se observa que en las estaciones E13, E22, E6 y E19, son las estaciones en donde se encontró mayor concentración, de POTs en un intervalo de 900 a 1700 ng/g.

El endosulfán es un compuesto químico parte de los COPs y ha sido prohibido por los efectos reportados en la salud y ecosistemas. En México el endosulfan está autorizado en 20 cultivos, entre los cuales están el maíz, algodón, frijol, diversas hortalizas y café (Arellano -Aguilar y Rendón-von Ostén, 2016). Este compuesto es biodegradable, pero el isómero β es más estable, pues en los informes se mencionan casos de semidesintegración de 60 días para el alfa endosulfan y de 800 días para el beta endosulfán.) (FAO 2000).

El endosulfán tiene una movilidad importante en el ambiente, siendo transportado principalmente por medio de la escorrentía, sin embargo; el isómero alfa, beta y sulfato de endosulfan que son compuestos activos del endosulfan no son propensos a la lixiviación. En los ecosistemas acuáticos también existe alto riesgo de contaminación principalmente por deriva, es decir, ocurre por un flujo de agua que se desvía sobre la superficie terrestre hasta llegar a un cuerpo de agua, ya sea río, lago o arroyos que pueden conectar en algunas ocasiones con ecosistemas acuáticos. La vida media en agua se calcula en 4 días, pero las condiciones anaeróbicas y un bajo pH alargan este tiempo de vida media. En general, la biodegradación del compuesto en agua o suelo depende de las condiciones climáticas y del tipo de microorganismos presentes (Nivia E. 1993).

En la Península de Yucatán ya se han identificado la presencia de endosulfán en cuerpos de agua de cenotes y se ha dicho que estos compuestos pueden causar daños ambientales importantes entre los cuales destacan la afectación de la especie *G.yucatanana*, Chi *et al.* (2011) reportan que la presencia de endosulfan pueden causar alteraciones en el sexo de los peces machos ocasionando feminización, lo que traería como consecuencia efectos en su dinámica poblacional. En este artículo se destaca el haber aún pocos artículos que relacionan el efecto y la presencia de plaguicidas.

El endosulfán se encontró en concentraciones que rebasan el RTLsed (Límite Umbral de Riesgo en sedimento) que es de 0.026 ng/g (Sebastian y Schulz 2015) y que es utilizado internacionalmente. En las estaciones E6 y E13 se presentan 160 y 180 ng/g, este último siendo aproximadamente 6500 veces superior al valor RTLsed

El Clorpirifos también rebasó el RTLsed. Presentó concentraciones de 3 a 3.6 ng/g, siendo el valor superior tres veces mayor al valor recomendado que es de 1.1 ng/g (Sebastian y Schulz 2015) , El Clorpirifos es un plaguicida que pertenece al grupo de los organofosforados y es considerado uno de los insecticidas usado ampliamente, pues se usa en frutas, granos nueces, hortalizas, ganado, plantas ornamentales, en campos de golf, edificios y para tratar madera. Su persistencia en el suelo va desde unos pocos días hasta 4 años dependiendo de la tasa de aplicación, el tipo de ecosistema y varios factores ambientales. La vida media de disipación es significativamente más larga en suelos orgánicos que en suelos minerales. El clorpirifos es muy tóxico, de forma crónica y aguda, para organismos acuáticos ya que se reconocen efectos como: descoordinación motora, retraso en la maduración, daño en el crecimiento y la reproducción, malformaciones y disminución de las poblaciones (Watts M. 2012).

El Clorpirifos como el endosulfán es menos persistente en condiciones ambientales tropicales las cuales se caracterizan por una degradación microbiana más rápida, fotodegradación y volatilización mayor. Su persistencia aumenta cuando la temperatura, el pH y la luz disminuyen (Watts, 2012). En la actualidad son los plaguicidas más empleados en la agricultura. En México, a los cultivos a los que se le aplica el mayor volumen de estos productos son: maíz, algodón, papa, chile, jitomate, frijol, trigo, aguacate, café y tabaco en cantidades que van desde 395 hasta 13,163 toneladas de plaguicidas al año. En el estado de Yucatán se reconoce a la agricultura como una de las actividades principales, lo cual representa un uso intensivo de plaguicidas y de igual forma se considera que se utilizan una gran variedad de insecticidas organofosforados y carbámicos principalmente para el control del dengue y horticultura, de tal forma que representan un uso de hasta el 70% en la horticultura (Pacheco- Garrido *et al.*, 2014).

Los efectos por el uso de plaguicidas organofosforados han sido reportados en una gran variedad de especies en la península de Yucatán. Se ha identificado intoxicación en aves, en la tortuga carey y en especies de peces como lo es *G. yucatanana*, pues se menciona que la inhibición a la enzima AChE es indicativa de la posible presencia de plaguicidas organofosforados y carbamatos, y que el significado biológico de la inhibición podría verse reflejada en lesiones neuronales y de comportamiento. Y, a pesar de que las dosis aún no son letales, estas lesiones pueden ocasionar una disminución de la capacidad de búsqueda de alimentos y alteraciones de comportamiento, haciéndoles fácil presa de sus depredadores (Pacheco-Garrido *et al.*, 2014).

En la estación E13 se identificó que se presentó una concentración de HCH's en sedimentos de 1,600 ng/g y E22 de 1,100 ng/g. El grupo de HCH's se caracteriza por ser altamente persistente en el ambiente, concentrándose en agua, aire, suelo y sedimentos. Donde puede contaminar a organismos expuestos, bioacumularse en los tejidos grasos y bioconcentrarse a través de la cadena alimenticia. Por ser un plaguicida de amplio uso, tiene usos muy variados. En México, se usa en el sector agropecuario, veterinario e incluso en el ambiente de salud humana (Avalos y Ramírez 2003).

En varias regiones del País se ha encontrado lindano (del grupo HCH's) sobre todo en sedimentos de sistemas lagunares y en organismos acuáticos. Algunos lugares donde se han encontrado han sido Veracruz, Puebla, Chiapas, Tabasco, Hidalgo y otros, pero no rebasa el límite permisible (NOM-127-SSA1-1994: 2mg/L), sin embargo, no se puede olvidar que es un plaguicida de riesgo para otras especies y para la población debido al proceso de biomagnificación (Avalos Gómez y Ramírez Gutiérrez 2003).

En Yucatán este plaguicida también ya ha sido encontrado en muestras de agua, pero no en sedimentos debido a que es poca la información sobre los efectos del lindano en el medio ambiente. Sin embargo, se menciona que el haberlo encontrado en concentraciones altas en muestras de agua implica futuras complicaciones en la salud, puesto que puede bioacumularse en los organismos en los diferentes puntos de la cadena alimenticia, comenzando desde microorganismos, invertebrados, peces, aves y finalmente en seres humanos. El lindano puede eliminarse lentamente de los organismos por medio de las heces, orina, y leche materna durante la lactancia (Poot-Angulo *et al.*, 2015).

En el catálogo oficial de plaguicidas publicado en 1998 en México por la Comisión para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), se señala que el lindano es un plaguicida de uso restringido en México por su alto índice de persistencia y gran movilidad en el ambiente. El destino y los efectos de los plaguicidas en el ambiente dependen de muchos factores, entre ellos: de las características y concentración del plaguicida; del tipo, número de fuentes de emisiones y su frecuencia de aporte; de la dinámica del área y de las características de los ecosistemas y organismos expuestos (Avalos Gómez y Ramírez Gutiérrez, 2003).

De acuerdo a las concentraciones de plaguicidas encontradas en las muestras de sedimento, se puede observar que en la estación E13 el lindano se encuentra a una concentración de 1,600ng/g, de tal forma que casi un 80% del total de plaguicidas (POT) para esta estación, este sea el compuesto químico con mayor presencia en la muestra. El caso es similar en la estación E22 y E19 que de acuerdo al gráfico de lindano, en la estación E22 se tuvieron concentraciones de 1,000 ng/g y en E19 800n/g y en el gráfico de POT para la primera estación en total se encontró una concentración de 1,200ng/g y en la segunda estación una concentración de 1,000 ng/g de plaguicidas organoclorados en la muestra. De acuerdo al análisis anterior, se puede determinar que las tres estaciones podrían estar recibiendo por medio de una fuente este tipo de plaguicidas y que debería de seguirse una evaluación, ya que como anteriormente se menciona es un plaguicida que puede ocasionar daños importantes en el ambiente como en la salud humana.

Sin embargo, podrían considerarse un monitoreo prioritario en la estación E19, ya que como anteriormente se mencionó, es una de las estaciones donde el lindano se encuentra en altas concentraciones, pero también se encontraron concentraciones altas de endosulfán y que de acuerdo al límite internacional esta concentración es superior casi 1,600 veces al valor umbral.

Posterior a los análisis estadísticos se llevó a cabo el análisis IBR (Integración de Respuesta de Biomarcadores-Beliaeff y Burgeot, 2001). El cálculo del IBR es una herramienta utilizada en diversos trabajos, sobre todo en evaluaciones de riesgo o en ecosistemas contaminados: Lethonen K. (2006), Raftopoulou E.K. Y Dimitriadis V.K. (2010), Serafim A. *et al.*, (2011), Broeg K., Woo-Keun *et al.*, (2013).

De acuerdo al análisis de Beliaeff y Burgeot (2001) primero se realiza una estandarización con los resultados obtenidos, que en este caso son los resultados promedio de las actividades y concentración medidas con sustratos e inhibidores específicos en machos y hembras de *G. yucatanana* que se denominan como *scores*. El IBR es en sí, el área del polígono obtenido. En las figuras 19 y 20 se presentan los IBR por estación.

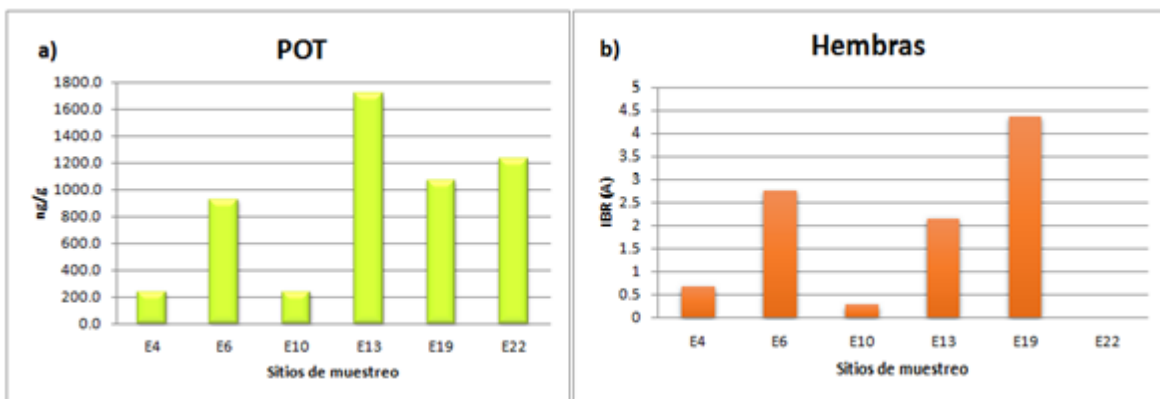


Figura 17. Obtención de IBR (índice de biomarcadores de respuesta): Herramienta que permite integrar y estandarizar un panel de biomarcadores. En este caso se observa la integración estandarizados de los biomarcadores AcHE y GST, y concentración de GSH medidos en machos de *G. yucatanana*, que permitió comparar las concentraciones de plaguicidas organoclorados totales encontradas en los sedimentos de cada estación de muestreo de acuerdo a la metodología seguida (Beliaeff y Burgeot 2001).

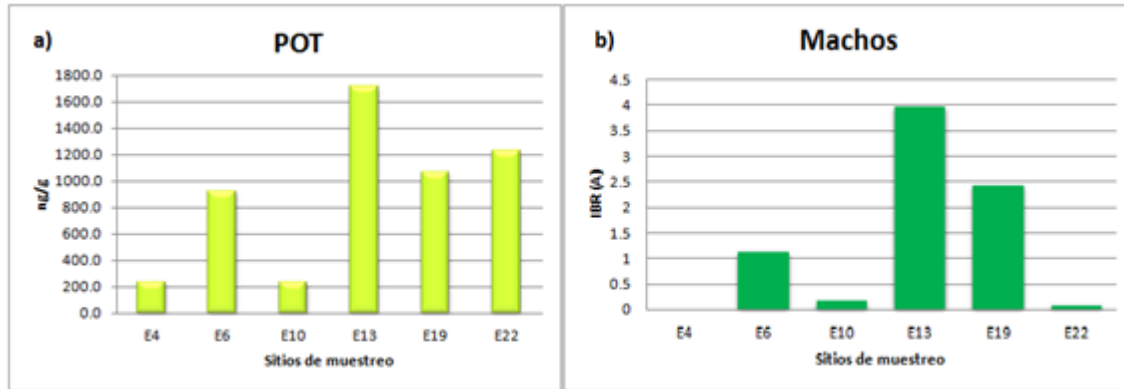


Figura 18. Obtención de IBR (índice de biomarcadores de respuesta), Es una herramienta que permite integrar y estandarizar un panel de biomarcadores. En este caso se observa la integración y estandarización de los biomarcadores AChE y GST, y concentración de GSH medidos en machos de *G. yucatanensis*, que permitió compararse con las concentraciones de plaguicidas organoclorados totales encontradas en los sedimentos de cada estación de muestreo de acuerdo a la metodología seguida (Beliaeff y Burgeot 2001).

De acuerdo a las áreas representadas en el IBR de hembras se observó que estas fueron mayores para las estaciones E19>E13 >E6. En el caso de los machos las áreas más grandes se observaron en las estaciones E13> E19 > E6. Al observar la gráfica de plaguicidas totales se observa que las estaciones con mayor concentración de plaguicidas son las estaciones E13 > E22 >E19 > E6. Lo cual tiene cierta similitud a lo encontrado en los biomarcadores, con excepción de la estación 22.

La discrepancia de estos resultados, se puede explicar por varias razones, y entre las observadas, se presentan las siguientes:

- a) No todos los plaguicidas organoclorados se comportan toxicológicamente igual, lo que indica que la respuesta en los biomarcadores va a ser diferente dependiendo del tipo de compuesto que esté presente en el medio. De hecho, algunos plaguicidas organoclorados no son inhibidores de la AChE (BVSDE (Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental, 2017)) ni utilizan el proceso de desintoxicación por conjugación con glutatión.
- b) Existen otros contaminantes que pueden contaminar el acuífero como lo son los metales, hidrocarburos, materia fecal y contaminantes emergentes (Pacheco Ávila y Pérez Ceballos (2004); Cobos-Gasca *et al.*, (2011); Arcega-Cabrera *et al.*, (2015); Derrien *et al.*, (2015); Poot

Angulo *et al.*, (2015)), lo que puede alterar la respuesta en los biomarcadores haciéndola mayor o menor.

- c) Las presencias de mezclas de contaminantes alteran la respuesta de los biomarcadores. Estudios anteriores han reportado que mezclas de plaguicidas con otros contaminantes presentes, modifican la respuesta medida. Los biomarcadores permiten evaluar únicamente una pequeña parte de la gran complejidad de todos los compuestos químicos que existen en el ambiente (Rendón-von Ostén, 2005).
- d) Las concentraciones de compuestos químicos en los sedimentos no siempre se puede tener una relación directa con la biodisponibilidad, pues un contaminante puede presentar efectos tóxicos sólo si se encuentra en una forma biodisponible y el compuesto puede incorporarse a la célula del animal o influir en el proceso normal del organismo (Betancur-Corredor *et al.*, 2013).

Como ya se mencionó anteriormente, las estaciones E13, E19, E6 y E22 fueron las estaciones en donde se encontraron las mayores concentraciones de plaguicidas organoclorados totales. Como se observa en la Figura 17 y 18, que de acuerdo a la hidrogeología conocida en la zona anillo de cenotes, las estaciones de muestreo se encuentran en puntos importantes dentro de esta hidrogeología, ya que las estaciones E13 y E19 son estaciones donde se drena el agua proveniente del sur, así como se encuentran municipios como Cuzamá, que es uno de los municipios que ofrece como atracción turística varios cuerpos de agua de cenotes. Así mismo, estos flujos hidrológicos, se descargan en dos municipios costeros, uno es en Celestún y que de acuerdo al número de plaguicidas totales encontrados y que de acuerdo a la hidrología esta estación E6 se encuentra cercana a esta salida costera. El otro municipio costero donde se descarga el agua proveniente del sur es Dzilam de Bravo, donde la estación E22 se encuentra cercana a esta salida y que es una de las estaciones donde de acuerdo al número total de plaguicidas organoclorados totales, se encontraron altas concentraciones de plaguicidas, sobre todo plaguicidas como: HCH, clordanos y DDT y metabolitos, que en su mayoría han sido prohibidos, por lo que las estaciones de muestreo de este trabajo o estaciones cercanas a estos flujos hidrológicos podrían seguir ofreciendo información de la presencia de contaminantes en los sitios así como se pueden utilizar herramientas como los biomarcadores y con ello poder erradicar problemas de contaminación importantes que pudieran inclusive afectar a cuerpos de agua de la zona costera.

Por otro lado, es interesante resaltar que de acuerdo a datos del anuario estadístico y geográfico de Yucatán 2015, se integra información de los censos del año 2013-2014 en el estado. En este se encuentran información relevante, la primera es, que de los 106 municipios que integran al estado de Yucatán, 97 de ellos coinciden en que unas de las actividades principales son agricultura y ganadería, y de la misma forma estas actividades son las que se practican principalmente en los 27 municipios que cubre la zona anillo de cenotes de este a oeste desde Celestún a Dzilam de Bravo. Cabe destacar que los municipios con colores son los municipios de los sitios de muestreo y que también son considerados parte de los municipios considerados entre los 27 que abarca la zona anillo de cenotes, pero los dos últimos municipios no son parte de los 27 municipios considerados, pero si son sitios de muestreo, por lo que fueron incluidos en la tabla: E4 (Tetíz) y E6 (Kinchil), que de igual forma son parte de los municipios en donde las actividades principales son la agricultura y ganadería.

Tabla 7. Actividades principales y superficies agrícolas sembradas en los 27 municipios que abarca la zona anillo de cenotes de acuerdo al Anuario Estadístico y Geográfico de Yucatán 2015.

Municipio	Actividad principal	Principales Cultivos	Superficie fertilizada (ha)	Superficie sembrada con semilla mejorada (ha)	Superficie atendida con servicios de asistencia técnica (ha)	Superficie sembrada con acciones fitosanitarias (ha)	Superficie mecanizada
Celestún	Agricultura y Pesca		0	0	0	0	0
Umán (E10)	Agricultura y Ganadería		270	12	0	0	0
Abalá	Agricultura y Ganadería		282	0	0	0	0
Chocholá	Agricultura y Ganadería		57	1	0	0	0
Maxcanú	Agricultura y Ganadería	Maíz grano	442	70	0	278	70
Kopomá	Agricultura y Ganadería		85	0	0	0	0
Opichen	Agricultura y Ganadería	Maíz grano	1584	1565	0	0	1565
Muna	Agricultura y Ganadería		3618	2728	790	790	3618
Chapab	Agricultura y Ganadería		1193	0	0	1193	0
Scalum	Agricultura y Ganadería		1997	30	28	1929	0
Tecoh (E13)	Agricultura y Ganadería		66	5	0	0	0
Tekit	Agricultura y Ganadería		38	209	0	0	0
Cuzamá	Agricultura y Ganadería		9	0	0	0	0
Homún (E19)	Agricultura y Ganadería		16	0	0	0	0
Huhí	Agricultura y Ganadería		53	0	0	0	0
Kantunil	Agricultura y Ganadería		167	0	0	0	0
Izamal	Agricultura y Ganadería	Chile verde	84	8	4	3218	0
Dzonocauich	Agricultura y Ganadería		72	0	0	3452	0
Tekal de venegas	Agricultura y Ganadería		46	2	0	1895	0
Quinatana Roo	Agricultura y Ganadería						
Sotuta	Agricultura y Ganadería	Chile verde	1621	336	1322	1321	1558
Sudal	Agricultura y Ganadería		96	0	0	984	0
Tunkás	Agricultura y Ganadería		313	2	8724	9	11
Cerrutilla	Agricultura y Ganadería	Pastos	200	0	9000	0	0
Buctotza (E22)	Agricultura y Ganadería	Chile verde, sandía, tomate rojo, pastos	110	22	12508	23	23
Dzilam de Bravo	Agricultura y Pesca		66	0	0	4160	0
Dzilam González	Agricultura y Ganadería	Sandía, hortalizas y papaya	0	21	0	15106	0
Tetiz (E4)	Agricultura y Ganadería	Hortalizas	35	5	0	0	0
Kinchí (E6)	Agricultura y Ganadería	Naranja	140	0	100	0	0

En la tabla 7 se observa que se incluyó en una de las columnas información acerca de los principales cultivos, sin embargo no fue posible encontrar esta información en todos los municipios, pero esta información que es de datos de del Anuario Estadístico y Geográfico de Yucatán 2015 que corresponden a la superficie fertilizada (ha) por principales cultivos según la disponibilidad en el año 2013, en los cultivos en donde se incorporaron fertilizantes químicos o sustancias agroquímicas fueron en Maíz de grano, limón, pastos, naranja y soya. En la tabla 7 se aprecia que es en el municipio de Buctzotz donde se han utilizado una gran cantidad de fertilizantes y debido a que en este se tiene muchos cultivos importantes de entre los cuales según la tabla 8 tanto en el cultivo de chile verde como en pastos en el año 2013 se reconoce haber aplicado fertilizantes en la región para este tipo de cultivo. Lo mismo sucede con los municipios de Tetiz y Kinchil donde se encuentran los sitios de muestreo E4 y E6 se reconoce que uno de los cultivos principales para tetiz son las hortalizas y en Kinchil los cultivos de naranja y en el año 2013 se reconoce que en este tipo de cultivos se utilizaron fertilizantes.

Tabla 8. Cultivos sembrados según el Anuario Estadístico y Geográfico de Yucatán 2014. Nota: Los cultivos seleccionados corresponden a los que alcanzaron el mayor valor de producción durante el año agrícola de referencia.

Cultivo	Total	Riego	Temporal
Total	76 667	22 802	53 865
Pastos	6 984	5 281	1 703
Maíz grano	55 582	5 915	49 667
Pepino	698	695	3
Naranja	2 510	2 510	0
Limón	3 230	3 230	0
Calabacita	742	742	0
Papaya	378	378	0
Aguacate	74	74	0
Chile verde	318	285	33
Berenjena	91	91	0
Sandía	530	455	75
Soya	2 061	600	1 461
Tomate rojo (jitomate)	136	136	0
Camote	16	16	0
Hortalizas	170	170	0
Resto de los cultivos	3 147	2 224	923

Otra información que fue posible obtener a través de los datos del Anuario estadístico y geográfico de Yucatán 2015, fue conocer si en estos municipios de los municipios que abarcan la zona anillo de cenotes se identifica el uso de fertilizantes. La información que se representa en la columna: Superficie Fertilizada (ha) en la tabla 7 se refiere al área sembrada que en su proceso de producción incorpora fertilizantes químicos o sustancias agroquímicas que mejoran el contenido de nutrientes del suelo. De igual forma en la tabla se integran otras 4 columnas; Superficie sembrada con semilla mejorada (ha): Se refiere a la superficie agrícola sembrada de cultivos cíclicos con semillas de variedad que ha tenido un proceso de mejoramiento genético o selección presentando un alto vigor, pertenece a una población con características similares y un grado de parentesco; Superficie atendida con servicios de asistencia técnica (ha): Se refiere a la superficie agrícola sembrada que contó con asesoría de personal técnico calificado para llevar a cabo en forma óptima las labores culturales; Superficie sembrada con acciones fitosanitarias (ha): Se refiere a la superficie sembrada con cobertura de acciones oficiales de protección de las plantas cultivadas contra la propagación e introducción de plagas y enfermedades; Superficie mecanizada: Es el área en la que se utiliza cualquier tipo de maquinaria agrícola como tractores, rastras, sembradoras, niveladoras, trilladoras, cosechadoras, para llevar a cabo las actividades de preparación del suelo, siembra, labores culturales y recolección de los frutos.

De acuerdo a la anterior información dentro de los municipios donde se encuentran los sitios de muestreo se puede observar que de dentro de los 6 municipios el municipio donde se reconoce que se utilizaron fertilizantes por la cantidad de hectáreas sembradas fue el municipio de E10-Uman, seguido los municipios de E6-Kinchil (140ha) y E22-Buctzotzs (110ha), y el municipio que reconoció menor cantidad de fertilizantes por hectárea es el municipio de E19-Homun. Para el caso de superficies sembradas con siembra mejorada, de acuerdo a los datos de la tabla en el municipio de E22-Buctzotzs fue donde se utilizaron 22 hectáreas y seguido el municipio de Umán con 12 hectáreas, en cuanto a los demás municipios en Tetiz y Tecoh se utilizaron 5 hectáreas y en los otros dos municipios de Homún y Kinchil no se utilizaron hectáreas para este tipo de cultivo.

En el caso de superficies atendidas con servicios de asistencia técnica se reconoce 12508ha en E22-Buctzotzs y en Kinchil con 100 hectáreas y en el resto de los municipios de muestreo no se tiene registro. Las hectáreas de Superficie sembrada con acciones fitosanitarias según los datos para los municipios de los sitios de muestreo solo en el municipio de E22-Buctzotzs se reconoce a 23ha como

espacios utilizados con acciones fitosanitarias. Y, por último, de acuerdo a los datos de la tabla de los municipios de interés en el municipio de E22-Buctzotzs se reconoce haber cultivado áreas con algún tipo de maquinaria agrícola, sembradoras, etc. Como se observa con estos datos en el municipio de Buctzotzs es en donde se reconoce la realización de diferentes actividades para obtener mejores resultados en sus cultivos, y reconociendo a través de los resultados obtenidos en las muestras de sedimentos analizadas para la estación E22, esta es una de las estaciones en donde en total se encontró una concentración alta de plaguicidas organoclorados (1,200 ng/g) con respecto a las demás. Sin embargo, en una de las estaciones (E13) que de acuerdo al total de plaguicidas organoclorados encontrados en la muestra, ya que en total se encontró una concentración de 1,700 ng/g y de acuerdo a lo datos del INEGI en este municipio solo se han reconocido 66 hectáreas sembradas con algún fertilizante y 5 hectáreas con superficie sembrada con semilla mejorada.

Por otro lado es interesante resaltar que de acuerdo al censo 2007 “unidades de producción con superficie agrícola y uso de tecnología según su empleo en cultivos o plantaciones por entidad y municipio” del INEGI (2017) el volumen de plaguicidas químicos utilizados en los municipios donde se localizan los cenotes estudiados fue cero (Tabla 7) , con excepción del municipio de Buctzotz donde se localiza la estación E22, en donde se reconoce en algunas hectáreas el uso de fertilizantes, herbicidas e insecticidas químicos, y que de acuerdo a los resultados en esta tesis en estas zonas se están encontrado concentraciones importantes de plaguicidas organoclorados totales, incluyendo plaguicidas ya de uso restringido o prohibido como lo es el endosulfán , lindano y el DDT y sus metabolitos.

Tabla 9. Áreas sembradas con diferentes tipos de tecnología por municipios de muestreo. Datos de encuesta Nacional INEGI. 2007

Municipio de sitio de muestreo	TETIZ	KINCHIL	Yaxcopoil localidad del municipio de UMAN	Pixyah localidad del municipio de TECOH	HOMÚN	BUCTZOTZ
Superficie agrícola total según tipo de tecnología aplicada para el manejo de cultivos o plantaciones en Yucatán (INEGI)	E4	E6	E10	E13	E19	E22
Superficie agrícola (ha)	850.9	2, 194.15	0	3, 945.04	1, 911.09	15,132.07
fertilizantes químicos	0	0	0	0	0	9.62
herbicidas químicos	0	0	0	0	0	19,43
incenticidas químicos	0	0	0	0	0	1,00
Otro tipo de tecnología	0	0	0	0	0	0

Realizando una comparación entre los resultados reportados en la tabla 9 y la tabla 7 para los municipios donde se encuentran los sitios de muestreos y se ha reconocido hectáreas en donde se han reconocido el uso de algunos fertilizantes, se observa que este ha sido progresivo, pues en la tabla anterior solo se reconoce al municipio Buctzotz como único sitio donde se habían empleado este tipo de sustancias químicas, sin embargo en la actual información, en todas las estaciones de muestreo se reconocen hectáreas en donde fueron utilizados fertilizantes. Así mismo, se nota un cambio diferente para el municipio de Buctzotz de acuerdo a la información obtenida en el año 2015, pues se observa que hay un aumento de diferentes estrategias de cultivo en el municipio, pero sobre todo se reconoce que hay una cantidad de 15,508 ha sembradas con asistencia técnica, es decir se contó con asesorías personales de técnicos calificados para llevar a cabo y en forma optimas labores culturales.

La información anterior permitió tener un pequeño panorama sobre el uso de sustancias químicas tóxicas como lo son los plaguicidas, sin embargo, en Yucatán, existe escasa información sobre la concentración de contaminantes orgánicos Hoogesteyn *et al.*, (2017), además de carecer de datos precisos del volumen y tipo de los cultivos presentes en los municipios donde se localizan los sitios

muestreados, y además de carecer de un marco legal para el uso de plaguicidas. Así como de los cultivos explotados cerca, que sería importante seguir con investigaciones que pudieran ofrecer una información más cercana a las problemáticas tanto ambientales como sociales, legislativas, económicas y así aportar con mejores soluciones a problemas de contaminación ambiental por este tipo de compuestos.

Aplicaciones en manejo ambiental

Con la información obtenida y disponible se considera que una estrategia que pudiera ayudar a disminuir el uso de plaguicidas en Yucatán es la implementación de un MIP. Los MIP o Manejo Integrado de Plagas es un programa de la FAO que comprende actualmente tres programas regionales: Asia, Oriente próximo y África Occidental. El MIP es un enfoque ecosistémico para la producción y la protección de cultivos que combina diferentes estrategias y prácticas para hacer crecer cultivos sanos y reducir al mínimo el uso de pesticidas (FAO, 2017).

Las técnicas de MIP ya han sido utilizadas en muchos cultivos de diferentes partes del mundo como en los de arroz y hortalizas en países de África Occidental, Ghana y Mali, así como en cultivos de maíz y algodón en Malawi, Mozambique, Zambia y Zimbawe, entre otros.

En general, no existen pasos específicos para un MIP, pues se trata de un planteamiento dinámico orientado a los agricultores, para resolver los problemas actuales del campo y solo existen recomendaciones de algunos métodos utilizados para el control de plagas. Los métodos son los siguientes:

1. Método de control preventivo: También llamado de control cultural, es uno de los métodos más económicos en donde se propone realizar las labores propias del manejo agrícola de manera efectiva y oportuna, para dificultar la aparición y supervivencia de plagas y enfermedades.
2. Método de control manual o mecánico: Consiste en la recolecta a mano de insectos, en estado de huevo, larvas o adultos. Así como retirar del campo de cultivo plantas enfermas o las partes de algunas de ellas que estén afectadas por la plaga o enfermedad.

3. Método de control físico: Es un método que busca destruir la plaga usando medios como el calor y el agua. Un ejemplo de ellos es el riego para el ahogo de larvas del suelo.
4. Método de control biológico: Es un método con el cual se enfrentan plagas y enfermedades usando organismos vivos, sean estos animales, insectos (predadores o parasitoides) bacterias, hongos o virus. Que se sustenta en el hecho de que muchas especies de organismos se alimentan o completan su ciclo de vida a costa de otros.
5. Método de control etológico: Es un estudio que se basa en el comportamiento y las preferencias de cada plaga en sus diferentes estados. Para entender este proceso se consideran las horas de desplazamiento de los insectos, sus hábitos alimenticios, su presencia por determinados colores, etc.
6. Método de control químico: Como su nombre lo indica consiste en el uso de productos sintéticos o químicos, y que se recomienda solo para los casos en los que la plaga o enfermedad ha alcanzado mayores niveles de gravedad.
7. Método de control legal: Método donde se considera a un conjunto de normas y reglamentos de alcance nacional, que regulan las épocas de siembra y cosecha, el uso de semillas, el ingreso de determinados productos a zonas libres de plagas, etc., a fin de establecer periodos de campo limpio y cuidar la actividad agrícola.

Los MIP preferentemente se deben de utilizar con métodos de control de plaga que cumplan con los siguientes requisitos:

1. Efectividad contra la plaga
2. Compatibilidad con otros métodos de control
3. Impacto ambiental nulo o bajo, como es el caso de parasitoides, depredadores, feromonas, etc.
4. Efectos duraderos en el medio y que contribuyan a modificarlo, que sea favorable con las plantas y menos apropiado para las plagas
5. Económicamente viable: desde el punto de vista costos/beneficio
6. Factibilidad del empleo de la técnica
7. Aceptación por los productores, y en general, por la sociedad.

Como en Yucatán de acuerdo con datos de INEGI (2014), el cultivo con mayor representatividad en la entidad es el maíz y naranja con una producción de toneladas de 83, 422.8 y 58, 025.7 respectivamente este podría ser uno de los cultivos que pudiera ser tratado a través de un método de control preventivo. Pues se han tenido reportes como el de Arellano Aguilar y Rendón-von Ostén (2016), en donde indican que para el control de las plagas del maíz se sigue utilizando el endosulfán. Resulta interesante que este sea uno de los plaguicidas que se encontraron en prácticamente todos los sitios muestreados en el presente trabajo y que se ha venido midiendo de forma histórica en todo el Golfo de México desde 1996 (Benítez y Bárcenas en Rendón-von Ostén, 2016).

Pero primeramente tener un método de MIP sería importante comenzar con un diagnóstico, donde se inicie con estudios de línea base sobre la disponibilidad de plaguicidas; tipo, volumen, presentaciones, formulas, patrones de uso, y la concentración de estos compuestos en el acuífero. Una vez identificadas las fuentes de contaminación para las aguas de cenotes se podrían implementar métodos como el de control preventivo que de acuerdo a su uso este método se puede impartir con eficacia y a bajo costo, pero dependerá del tipo de plaguicidas como el tipo de cultivo para elegir un método. Un ejemplo destacado del método de control preventivo fue realizado en Indonesia, donde a través de la creación de la técnica de capacitación participativa se llevó a cabo en el campo actividades y se le denominó como Escuela Agrícola en el Campo. En la escuela los campesinos se reunían una vez por semana durante la temporada de 12 semanas de la campaña agrícola, que fue desde el momento del trasplante hasta la cosecha. En la escuela se ofrecían conocimientos de la ciencia básica y de las técnicas de las que dependía el éxito del MIP. Cada uno de los agricultores sembró sus parcelas y en ellas estudiaban temas relacionados a sanidad vegetal, aprovechamiento del agua, condiciones meteorológicas, densidad de las hierbas y enfermedades, así como aprendían a diferenciar las “plagas” de los insectos “buenos”, es decir de los depredadores que impiden que aumente la población de los dañinos (FAO, 2017)

Una de las posibles ventajas que ayudarían a la implementación de un MIP de control preventivo y que se ha observado a través de los datos de INEGI 2015, es que 8 de 27 de los municipios que se encuentran donde abarca la zona anillo de cenotes ya ha tenido un acercamiento a esta técnica en estos últimos años y ha sido aplicada a una parte considerable de hectáreas, donde se han empleado servicios de asistencia técnica, que es similar a la que se propone en el método de control preventivo.

El uso de los métodos de MIP de acuerdo a las experiencias donde ha sido aplicada, éstas han sido satisfactorias, además de que permiten una mezcla de estrategias que pueden complementar los objetivos que se persigan. De tal manera que, de acuerdo a la circunstancia y el tipo de problema que se presente, en el MIP se pueden integrar y utilizar la información recabada con otras herramientas como SIG u otros métodos que puedan ayudar a la evaluación o efectividad a largo plazo de un MIP.

Por lo anterior considero que podría ser un paso importante la realización de estrategias como el MIP que permitan disminuir el uso de plaguicidas en Yucatán, ya que de acuerdo a la información disponible se observa que todos los 106 municipios de Yucatán la agricultura es una de las actividades principales por lo cual también no debería dejarse de lado que hay otras actividades que se realizan en la ciudad como los que son empleados para el control de vectores y control de plagas que también deberían de ser incluidos en los planes de manejo para así tratar el problema de estos contaminantes en todas sus fuentes.

Además en Yucatán se ha identificado que uno de los problemas que también tiene la población es el mal uso de los plaguicidas ya que se llegan a usar dosis excesivas y sobre todo la falta de equipo de protección así como se identifican otros problemas de Salud, como lo reporta la Universidad Autónoma de Yucatán, ya que revela que por lo menos en 20 cenotes de 18 municipios del estado hay altas concentraciones de plaguicidas que se transmiten en la sangre y la leche materna de las mujeres que toman habitualmente agua de pozos (El diario de Yucatán, 2013). De hecho, se calcula que un 70 o 75% de los cenotes de Yucatán están infestados de bacterias provenientes del lavado de letrinas, actividades porcícolas o fosas sépticas, por lo cual no es recomendable el consumo de esta agua (La jornada, 2013). Desde el punto de vista social esta podría ser una de las principales atenciones que se deben considerar para el monitoreo de los cuerpos de agua de cenotes como, así como en los municipios donde se presenten este tipo de problemáticas sería óptimo comenzar con la implementación de estrategias como un MIP.

Por otro lado, sería de gran ayuda seguir sumando esfuerzos con más estudios en la zona para conocer que otro tipo de contaminantes se encuentran en la zona, pero sobre todo sería importante sumar más esfuerzos en los contaminantes que ya se han incluido en la lista de los COPs, pues debido a que muchos de estos compuestos pueden permanecer por más tiempo en el ambiente por su composición química, así como debido a diferentes factores ambientales. Sobre todo, se debe de seguir prestando atención a los monitoreos en la zona anillo de cenotes por la permeabilidad del suelo de Yucatán, ya que si se siguen monitoreo constantes se podrían implementar estrategias que ayuden a la conservación de especies de gran valor ecológico o bien prevenir con estrategias de biorremediación u otras la protección de cuerpos de agua donde la contaminación pueda causar problemas significativos.

CONCLUSIONES

1. Los resultados indicaron diferencias significativas entre sexos para cada biomarcador medido, para ACHE se obtuvo menor actividad promedio en hembras (90.23 nmol/min/mg proteína) que en los machos (156.5 nmol/min/mg proteína). En GSH se presentó una actividad promedio mayor en hembras 0.168 nmol/mgtejido que en machos 0.1188 nmol/mgtejido. En la actividad de GST se obtuvo una actividad promedio mayor en machos (1.307 umol/min/mg proteína) que en hembras (0.833umol/min/mg prot).
2. La correlación con datos morfométricos y los biomarcadores medidos indicó que no hubo correlación ni linealidad.
3. Se determinó que no existen diferencias significativas en los valores de los biomarcadores utilizados entre las estaciones muestreadas para machos y hembras.
4. Fue posible cuantificar plaguicidas organoclorados en el sedimento de todos los sitios muestreados E13>E22>E19>E6>E10>E4. Los plaguicidas que se encontraron en mayor concentración son los HCHs y el endosulfán.
5. Con respecto al límite umbral de riesgo para el endosulfán (0.026 ng/g), se determinó que para prácticamente todas las estaciones (excepto E10) lo rebasaban, en algunos casos como la E6 y E19 en un factor de miles de veces. Para el Clorpirifos, se determinó que en las estaciones que se cuantificó este plaguicida E4, E6 y E13 rebasaban por lo menos en un factor de 3 el valor del límite umbral de riesgo (1.1 ng/g).
6. En cuanto a la relación de resultados de los biomarcadores y las muestras de sedimentos a través de IBR, se observó un mayor valor de IBR para las estaciones E13, E19 y E6. Las estaciones E13 y E19 son estaciones donde se drena el agua proveniente del sur y la estación E6 está en la zona de salida del agua en la zona de Celestún.
7. Existió una discrepancia entre los sitios con mayor IBR respecto a los sitios con mayor concentración de contaminantes (en especial la estación E22), esto es debido a otros factores que no fueron considerados, como la presencia de otros contaminantes, la biodisponibilidad, la especificidad de los biomarcadores empleados y al hecho que las mezclas de contaminantes son únicas en cada muestra.

8. Dada la falta de regulación en el uso de plaguicidas en la región y debido a que se han medido plaguicidas de uso restringido y/o prohibido, que en algunas estaciones se rebasaron los límites de umbral de riesgo permitidos internacionalmente, y debido a que ya se observa una relación con el efecto medido en biomarcadores de especies silvestres se recomienda que se sigan haciendo biomonitoreos de la zona, para obtener datos que nos lleven a un mejor manejo del uso de plaguicidas en el estado de Yucatán.

BIBLIOGRAFIA

Serafim R., Company B., Lopes V.F., Fonseca S., Franca R.P., Vasconcelos M.J., Bebianno H.N. (2012). Application of an Integrated Biomarker Response Index (IBR) to Assess Temporal Variation of Environmental Quality in Two Portuguese Aquatic Systems. *Ecological Indicators*. Vol.19 pp.215-225.

Arcega-Cabrera, F., Garza-Pérez, R., Noreña-Barroso E., Ocegüera-Vargas I. (2015). Impacts of Geochemical and Environmental Factors on Seasonal Variation of Heavy Metals in a Coastal lagoon Yucatán, México. *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology*. Vol. 94. Pp. 58-65

Albert A. L. y Benítez J.A. (2005). "Impacto Ambiental de Los Plaguicidas En Los Ecosistemas Costeros. En: Botello A.V., Rendón von Ostén, Benítez J. A. y Gold Bouchot G. (eds.). Golfo de México contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y Tendencias, 2da. Edición. pp. 121-140. ISBN: 968-5722-37-4

Arellano Aguilar O., Rendón-von Ostén J. (2016). La Huella de Los Plaguicidas En México.

Consultado en línea en:

http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comida-sana/Plaguicidas_en_agua_ok_EM.pdf.

Argota Pérez G. y González Pérez Y. (2013). Determinación enzimática y metales pesados en cerebro e hígado del modelo ecotoxicológico *Gambusia punctata* (Poecillidae). *MEDISAN*. Vol. 17 No. 2 pp. 221-229.

Avalos Gómez M. y Ramírez Gutiérrez J. (2003). Situación del Lindano en México. *Gaceta ecológica* No.69 pp.93–100.

Beliaeff Benoit y Thierry Burgeot. (2001). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 21 pp.1316–22.

Betancur-Corredor B. Pino N., Peñuela Gustavo A., Cardona-Gallo S. (2013). Biorremediación de Suelo Contaminado Con Pesticidas: Caso DDT. *Gestión y Ambiente* Vol.16 No.3 pp.119-135.

Broeg K., Lethonen K. (2006). Indices for the Assessment of Environmental Pollution of the Baltic Sea Coasts: Integrated Assessment of a Multi-Biomarker Approach. *Marine pollution bulletin* Vol. 53 pp.508–522.

BVSDE (Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental). Plaguicidas Inhibidores de Las Colinesterasas. Consultado en línea en:

<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/040073/040073-02.pdf>. Consultado: octubre 2016.

Carvalho-Neta Fortes R.N., Robledo Torres A. y Abreu-Silva A.L. Biomarkers in catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from polluted and Non-polluted areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). *Alpp Biochem Biotechnol* (2012). Vol. 166 pp.1314-1327

Cobos Gasca V., Barrientos Medina R., Navarro Alberto J. y Rendón-von Ostén J. (2014). Plaguicidas organoclorados: contaminantes persistentes en cenotes de Yucatán. *Cuerpo Académico de Ecología Tropical, Departamento de Ecología tropical, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias UADY*. Vol. 7. No. 1. Pp. 24-26.

Cobos Gasca V.M., Barrientos Medina R., Chi Novelo C. (2011). Los plaguicidas y su impacto sobre la fauna silvestre de la Península de Yucatán. *Cuerpo Académico de Ecología Tropical, Departamento de Ecología tropical, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias – UADY. Bioagrociencias*. Vol. 4. No.2. pp. 4-7.

D Bull I. (2008). *Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas (GC / MS)*. Universidad de Bristol. Consultado en línea: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html> (March, 2016).

del Puerto Rodríguez A. M., Suárez Tamayo S. y Palacio Estrada D.E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, vol. 52, núm. 3, septiembre-diciembre pp. 372-387

Derrien Morgane, Arcega-Cabrera, Libertad Velazquez, Kantún Manzano, Capella Vizcaino (2015). Sources and distribution of organic matter along the ring of cenotes, Yucatán México: Sterol markers and statistical approaches. *Science of the total Environment*. Vol. 511. Pp.223-229.

Diario de Yucatán (2013). *Mayoría de cenotes en Yucatán estan contaminados*. Consultado en línea: <http://yucatan.com.mx/merida/mayoria-de-cenotes-en-yucatan-estan-contaminados>.

EcuRed (2011). *Escorrentía Superficial*. Enciclopedia colaborativa de la red cubana: 3. Consultado en línea en: https://www.ecured.cu/Escorrentía_Superficial (March 28, 2016).

EPA (1994). Method: 8250A. Semivolatle organic compounds by gas Chromatography/mass Spectrometry (GC/MS).pp. 1-36

EPA (2007). Method: 3550C. Ultrasonic extraction. pp. 1-17.

EPA (2007). Method: 8270D. Method 1699: Pesticides in water, soil, sediment, biosolids and tissue by HRGC/HRMS. pp. 1-96.

EPA (2007). Method: 8270D.Semivolatle organic compunds by gas Chromatography/mass Spectrometry (GC/MS). pp. 1-72.

FAO (2016). *CAPÍTULO 4 - LOS PLAGUICIDAS, EN CUANTO CONTAMINANTES DEL AGUA*. Realizado por el Departamento de Desarrollo Sostenible de la FAO. Consultado en línea <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm> (January 25, 2016).

FAO 2000. *Evaluación de la Contaminación del suelo. Manual de referencia. Colección FAO: Eliminación de plaguicidas*. Consultado en línea: <http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S09.htm#TopOfPage> (Febrary 25, 2016).

FAO, (2017). *Integrated Pest Management (IPM)*. Consultado en línea: <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/>.

Gold Bouchot G., Zapata Pérez O., Ceja Moreno V., Rodas Ortiz J.P., Domínguez Maldonado J. A., del Río M., Rodríguez F., Ku Chan P.M, Espínola Pantí D. (2005). Informe: Diagnostico Regional de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en la Península de Yucatán y el sur del Golfo de México. Departamento de Recursos del Mar, CINVESTAV Unidad Mérida.

Gutiérrez M.C. y Droguet (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes del mal olor. Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial. No. 122. pp. 35-41.

Hernández-Antonio A. y Hansen M. A. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Vol. 27. No. 2 pp. 115-124.

Hoogesteijn Almira, Medina Pérez S., Febles Patron J. L., Ceja Morena V., Gold-Bouchot G. (2017). Contaminación: La Necesidad de Crear Sistemas de Monitoreo.” Biodiversidad y desarrollo humano de Yucatán

INEGI (2009). Superficie agrícola total según tipo de tecnología aplicada para el manejo de los cultivos o plantaciones por entidad y municipio. Censo agropecuario 2007, VII censo Agrícola, Ganadero y Forestal. Consultado en línea:

http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/proyectos/agro/agricola/2007/tabulados/Tabulado_Mpio_VIII_CAGyF_20_31.pdf.

INEGI (2014). Porcentaje de unidades de producción con agricultura a cielo abierto por tipo de tecnología empleada. Encuesta Nacional Agropecuaria 2014. Consultado en línea: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/encuestas/agropecuarias/ena/ena2014/doc/tabulados.html>

La jornada (2013). En peligro, cenotes de Yucatán por contaminación, saqueo y destrucción. Consultado en línea: <http://www.jornada.unam.mx/2013/02/02/estados/030n1est>

Marín Stillman L.E., Pacheco Ávila J.G. y Méndez Ramos R. (2005). Hidrogeología de la Península de Yucatán. En Jiménez B. y Marín L. (eds). El agua en México vista desde la academia. pp. 159-172. ISBN 968-7428-22-8.

Martin-Diaz M.L., Blasco J., Sales D., DelValls T.A. (2004) Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and field surveys. Trends in Analytical Chemistry. Vol. 13. No. 10-11 pp.807-817.

Martínez M.A y Gavilán A. (2004). La investigación en México en materia de compuestos orgánicos persistentes. Gaceta ecológica. No. 72. pp. 5-20.

Méndez González L (2010). Ficha Informativa de los Humedales Ramsar Versión 2009-2012. SEDUMA. Dirección de Conservación de la Biodiversidad.

Mondragón Sánchez A. y Rodas Regil O. (2011). Hábitos Alimentarios de Gambusia yucatanana en La División Académica de Ciencias Biológicas. Revista de divulgación Kukulcán. Vol 18. No.32. pp. 43-47 ISSN: 1665-0514.

Nivia Elsa (1993). PELIGROS DEL ENDOSULFAN (THIODAN). RAP (Red de Acción de Plaguicidas). Consultado en línea: http://www.rap-al.org/db_files/PlaguiAL_PpioAc_Endosulfan_FolletoPeligrosDel_1993.pdf (August 28, 2016).

Ochoa, D.M. Y J.F. González. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Vol. 55. PP. 115-126. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Pacheco Ávila J. G. y Cabrera Sansores S. A. (2013). Calidad del agua subterránea en el estado de Yucatán después del Huracán Isidoro (2002). pp. 21-38. ISBN: 978-607-9060-13-8

Pacheco Garrido G., Barrientos Medina R., Navarro Alberto J., Cobos Gasca V. y Rendon von Osten. (2014). Evaluación temporal de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en el pez mosquito, *Gambusia Yucatanensis* (Regan 1914), provenientes de 3 cenotes de Yucatán, México. En: A.V. Botello, J. Rendón von Osten, J. A. Benítez y G. GoldBouchot (eds.). pp. 71-86 en Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. ISBN. 978-607-7887-71-3.

Padilla-Vivas B., Diez Sanz F.V. y Ordoñez García S. (2005). Tratamiento de efluentes acuosos contaminados con compuestos organoclorados. Ingeniería del Agua. Vol.12, No. 4. pp. 361-372.
Pérez Ceballos R. y Pacheco Ávila J. (2004). Vulnerabilidad del agua subterránea a la contaminación de nitratos en el estado de Yucatán. Ingeniería Vol. 8 No. 1 pp. 33-42

Pérez Herrera N.E, Alvarado Mejía J.A., Castillo Burguete M.T, Gonzales Navarrete R.L., Quintanilla Vega M.B. (2012). Efectos reproductivos en agricultores expuestos a plaguicidas en Muna Yucatán. pp. 79-89. SEMARNAT e Instituto Nacional de Ecología. del Pont Lalli R.M (eds). Género, Ambiente y Contaminación por Sustancias Químicas. ISBN: 978-607-8246-13-7.

Pérez-León S. y Schmitter soto J.J. (2007). Distribución y taxonomía del género *Gambusia* (Telostei: Poeciliidae) en el norte y oriente de la Península de Yucatán, México. Universidad y ciencia. Vol.23 No. 2 pp. 167-171

Poot Angulo L., Leal-Bautista R.M. y Casas Bertrán D.A. (2015). Los suelos como amortiguadores del transporte de contaminantes químicos al acuífero en la Riviera Maya, México. pp. 5. Unidad de Ciencias del Agua, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Raftopoulou EK. Y Dimitriadis V. (2010). Assessment of the Health Status of Mussels *Mytilus Galloprovincialis* along Thermaikos Gulf (Northern Greece): An Integrative Biomarker Approach Using Ecosystem Health Indices. Ecotoxicol Environ Saf. Vol. 73, No. 7.

Rendón-von Ostén J. (2005). Uso de los biomarcadores en ecosistemas acuáticos. En: Botello A.V. Botello, J. Rendón von Osten, J. A. Benítez y G. GoldBouchot (eds.). Golfo de México contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da. Edición. pp. 121-140. ISBN: 968-5722-37-4

Rendón-von Ostén J. (2015). Uso de biomarcadores en *G. yucatanensis* para la evaluación de la calidad de cuerpos de agua: validación y su aplicación en Biomonitorio. En: Kauffer Michel y Escobar Castillejos (eds.). De Chiapas a la Península de Yucatán: Intersticios hídricos. 1ra. Edición. pp. 197-209. ISBN: 978-607-8207-99-2.

Rodríguez-Fuentes G., Jeff Asmtrong y Schlenk D. (2008). Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal Wastewater outfall in southern california. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*. Vol. 69 pp. 466–71

Rodríguez-Fuentes G., Marín López V. y Hernández Márquez E. (2016). Cholinesterases in *Gambusia yucatana*: Biochemical Characterization and its relationship with sex and total length. *Bull Environ Comtam Toxicol*. Vol. 97. pp. 776-780.

Rodríguez-Fuentes G., Soto M., Luna Ramirez K. (2013). Cholinesterase inhibition due to exposure to UV filters on a tropical Damselfish: *abudedefduf saxatilis*. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*. Vol. 96 pp.99–102

Sánchez-Chávez G. y Salceda R. (2008). Enzimas polifuncionales: El caso de la Acetilcolinesterasa. Stehle S. y Schulz R. (2015). Agricultural insecticides threaten Surface waters at the global scale. *Environmental Sciences*. Vol. 112 No. 18 pp.5750-5755.

Tejedor Gilmartín C. (2006). “Guía de estudios de la bioquímica ambiental”. Universidad de Alcalá Madrid (UAH) Consultado: http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/temario.htm (February 15, 2016).

Toro-Restrepo B. (2011) Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista Azul*. No. 32. pp. 121-127.

Torres Rodríguez D., Capote Luna T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: Uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*. Vol. 13. pp. 2-6.

Watts Meriel. 2012. Clorpirifos: Un Posible COP a Nivel Global. Pesticide Action Network Norteamerica (PANNA). Consultado en línea: http://www.rap-al.org/articulos_files/Clorpirifos_Rev_.pdf (oct. 21, 2016).

Woo-Keun K., Sung-Kyu L., Kyungho C., Jinho J. (2013). Integrative assessment of biomarker responses in pale chub (*Zacco platypus*) exposed to copper and benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*. Vol. 92 pp.71-78

ANEXOS

Anexo 1. Datos utilizados para la realización de análisis estadísticos obtenidos en *G.yucataná*.

Etiqueta	Estación	Género	LT	LP	A	ACHe	GST	GSH
E4-4	4	M	29	29	29	121.890	46.748	0.046
E4-5	4	M	31	31	31	106.860	50.389	0.173
E4-6	4	M	29	29	29	285.819	62.131	0.112
E6-2	6	M	25	25	25	139.843	62.126	0.168
E6-6	6	M	27	27	27	213.201	91.638	0.250
E6-7	6	M	25	25	25	204.843	75.390	0.081
E10-3	10	M	32	32	32	84.592	94.892	0.080
E10-4	10	M	35	35	35	178.997	109.213	0.193
E10-5	10	M	33	33	33	87.617	67.370	0.063
E10-6	10	M	29	29	29	92.386	105.042	0.117
E10-7	10	M	32	32	32	196.210	77.506	0.059
E10-9	10	M	34	34	34	124.668	76.727	0.079
E13-5	13	M	33	33	33	99.838	78.407	0.065
E13-7	13	M	33	33	33	153.453	68.877	0.052
E13-8	13	M	36	36	36	58.579	93.028	0.322
E19-1	19	M	27	27	27	101.788	58.714	0.095
E19-7	19	M	20	20	20	187.355	90.286	0.104
E19-8	19	M	29	29	29	207.191	90.527	0.130
E22-1	22	M	31	31	31	91.849	62.745	0.136
E22-2	22	M	27	27	27	145.377	75.076	0.072
E22-3	22	M	31	31	31	258.784	71.059	0.095
E22-4	22	M	28	28	28	272.774	46.075	0.173
E22-6	22	M	28	28	28	123.344	45.323	0.078
E22-10	22	M	26	26	26	155.515	49.228	0.097
E4-1	4	H	44	36	11	68.854	61.911	0.074
E4-2	4	H	47	37	12	57.026	65.342	0.192
E6-1	6	H	31	25	6	110.389	28.307	0.238
E6-3	6	H	31	24	7	103.424	93.486	0.184
E6-4	6	H	28	20	6	96.871	47.338	0.183
E10-8	10	H	50	40	12	43.125	82.317	0.083
E13-1	13	H	34	28	7	58.213	59.359	0.276
E13-2	13	H	29	22	7	59.549	39.906	0.156
E13-4	13	H	31	24	7	88.210	39.082	0.157
E13-6	13	H	28	23	7	110.359	82.318	0.070
E13-9	13	H	56	47	15	115.557	73.891	0.222
E13-10	13	H	27	22	6	118.875	48.484	0.136
E19-10	19	H	35	28	8	59.648	45.913	0.120
E22-5	22	H	29	24	5	107.640	45.562	0.108

Estacion	Plaguicidas							PlagOC Totales
	HCHs	Drines	Clordanos	Endosulfán	DDT y metabolitos	Clorpirifos	Metoxicloro	
E4	175.9	14.7	28.3	19.5	n.d.	3.4	n.d.	242.7
E6	703.6	8.3	20.5	186.3	3.6	3.6	n.d.	926.0
E10	180.6	5.4	10.9	n.d.	20.9	n.d.	20.1	239.0
E13	1596.1	7.4	10.7	56.3	19.3	3.5	17.8	1711.1
E19	838.8	24.3	12.5	168.7	25.2	n.d.	n.d.	1069.4
E22	1154.9	8.2	19.1	17.5	27.4	n.d.	n.d.	1227.2