

Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ACETILCOLINESTERASA  
(AChE), COMO EFECTO DE TOXICIDAD POR INSECTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS SOBRE CAMARÓN BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*).

Por

JUAN CARLOS BAUTISTA COVARRUBIAS

Tesis aprobada por la

UNIDAD MAZATLÁN  
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de

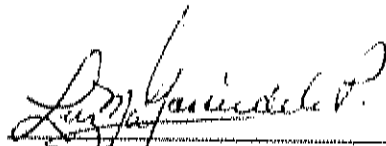
MAESTRO EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa.

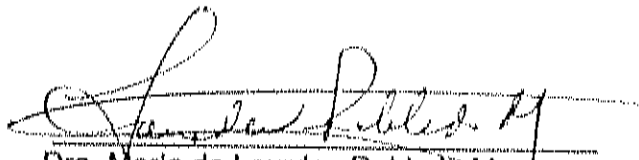
Abril del 2001

## APROBACION

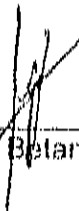
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Juan Carlos Baulista Covarrubias, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con Especialidad en Acuicultura y Manejo Ambiental.



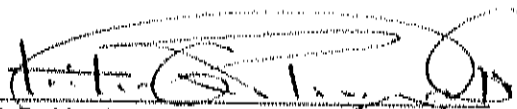
Dra. Luz María García de la Parra  
Director de Tesis.



Dra. María de Lourdes Robledo Marengo



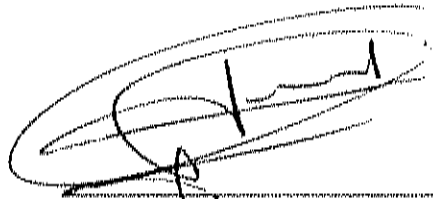
Dr. Miguel Betancourt Lozano.



M.C. Hector G. Plascencia Gonzalez

## DECLARACION DEL AUTOR

Se permiten citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe de la Unidad Mazatlán del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora C.P. 83000 México, para citas o consultas más completas con fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso al autor.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'Juan Carlos Bautista Covarrubias'.

Juan Carlos Bautista Covarrubias

## DEDICATORIA

A MI FAMILIA; Por hacerme olvidar con sus risas todos los momentos difíciles, y por ser la causa de mi afán por superarme día con día.

A mis Hijos, Seomara Justine y Leonardo Damián Bautista Díaz, por ser parte muy importante de mi vida, y porque representan la inspiración por seguir siendo cada día mejor.

A mi esposa, Alma Celina Díaz Flores, por su comprensión y paciencia durante todo el tiempo que permanecimos distanciados, y por el amor y el cuidado que tiene a nuestros hijos.

A mi madre, María del Refugio Covarrubias Isiordia, por su gran esfuerzo realizado desde el inicio de mis estudios, y por disfrutar tanto cada uno de mis logros.

A mi padre Juan Bautista Gómez, por ver en él, la tenacidad y entusiasmo por lograr lo que se propone en esta vida y lograrlo orgullosamente al finalizar una meta.

A mis hermanos que en todo momento están conmigo y estarán por siempre; Miguel, Lilia, Irma, Carmen, Isela, Jorge, Salvador e Idalia.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer especialmente a aquellas personas e Instituciones que confiaron en mi y de quien incondicionalmente tuve todo el apoyo en la realización del presente trabajo:

Dra. Luz María García de la Parra, por ser parte fundamental en el trabajo realizado, así como también, por su apoyo académico y disponibilidad durante la fase experimental y revisión de tesis.

Dr. Miguel Betancourt Lozano, por toda la confianza brindada a mi persona, así como todos los consejos y comentarios constructivos en la realización del presente trabajo.

Dra. Lourdes Robledo Marengo, por su gran apoyo en mi proceso de superación, así como por sus valiosos comentarios en mi formación profesional.

M.C. Hector G. Plascencia G., por sus comentarios y revisión del presente trabajo, así como por el apoyo en la identificación de las especies utilizadas en el trabajo de tesis realizado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por haber dado la oportunidad de recibir conocimientos constructivos del personal en general que allí labora.

Al Dr. Arturo Ruiz Luna, por su disponibilidad y apoyo con material bibliográfico, así como también por su apreciada amistad.

Universidad Autónoma de Nayarit, por el apoyo y confianza puesta en mi persona, como también el apoyar la investigación y la superación académica.

A MSP. Saúl Aguilar Orozco, Director de la Dirección de Investigación Científica de la UAN., Dra. Aurora García Sandoval, Directora de la Secretaría Académica de la UAN y al Dr. Julio Mú por su apoyo e impulso en la realización de mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por que el presente trabajo se realizó con el apoyo al proyecto #28345B

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Estación – Mazatlán por el permitir utilizar las instalaciones del laboratorio de Química Ambiental a cargo del Dr. Fernando González. De igual forma, a Clarita Ramírez por su gran apoyo con material bibliotecario.

A cada uno de los investigadores que laboran en el CIAD-MAZATLAN, por haberlos conocido y contar con su apreciable amistad.

A cada uno de mis compañeros de generación; Carlos Cuenca, Ernesto Castro, Gustavo Rodríguez, Silvia López, Irma Martínez, Carlos Navarro y Nidia Araiza. Por compartir alegrías y desveladas. También a aquellos compañeros que no son de mi generación pero que forman parte de una buena amistad; Lenin, Ramón, Roberto, Fabián, Armando, Nora, Paty, Sonia, Lupita, Felipe, Esthela, Socorro, Selene, .MariSol, Alicia, Perla, Dilian, Migdalia.

## CONTENIDO

CONTENIDO	I
INDICE DE TABLAS	IV
INDICE DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Biología del camarón	4
2.1.1 Morfología externa e interna	4
2.1.2 Ciclo de vida	5
2.2 Plaguicidas Organofosforados	7
2.2.1 Distribución y Transporte Ambiental	10
2.2.2 Transformación	10
2.2.3 Metabolismo	12
2.2.4 Modo de Acción	14
2.2.5 Toxicidad	17
2.3 Bioensayos de toxicidad	20
2.3.1 Tipos de bioensayos	22
2.4 Colinesterasas	23
2.4.1 Acetilcolinesterasa	25
2.4.2 Marcadores biológicos	26
3. OBJETIVOS	31

4. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Material biológico	33
4.2 Medición de AChE	34
4.2.1 Preparación de reactivos	34
4.2.1.1 (tampón fosfato)	34
4.2.1.2 Solución de reacción	34
4.2.1.3 Solución de reacción (proteína)	34
4.3 Preparación de muestras	35
4.3.1 Homogeneización y centrifugación	35
4.3.2 Determinación de la concentración de proteínas	36
4.3.3 Análisis de la actividad de AChE	36
4.4 Caracterización <i>in vitro</i> de colinesterasa	39
4.4.1 Actividad de AChE con tres diferentes sustratos	39
4.4.2 Inhibición de la actividad de AChE utilizando tres diferentes inhibidores	41
4.4.3 Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad de AChE con diferentes compuestos organofosforados (metamidofos, malatión y diazinón)	42
4.4.4 Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad de AChE con tres presentaciones de metamidofos (comercial, estándar y técnico).	43
4.5 Experimentos <i>In vivo</i>	44
4.5.1 Determinación de la concentración letal media (CL <sub>50</sub> – 96h) del metamidofos en camarón blanco	44
4.5.2 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> – 96h)	45
4.5.3 Inhibición de la actividad de AChE a concentraciones subletales de metamidofos	46



4.5.4 Estimación de la recuperación de la actividad de AChE después de la exposición a metamidofos	47
4.6 Muestreo de campo	48
4.7 Análisis estadístico	48
5. RESULTADOS	49
5.1 Experimentos <i>In vitro</i>	49
5.1.1 Actividad de AChE con tres diferentes substratos	49
5.1.2 Inhibición de la actividad de AChE utilizando tres diferentes inhibidores	51
5.1.2.1 Determinación del porcentaje de inhibición	56
5.1.3 Inhibición de la actividad de AChE con diferentes compuestos organofosforados (metamidofos, malatión y diazinón)	57
5.1.4 Inhibición de la actividad de AChE en tres presentaciones de metamidofos (estándar, técnico y comercial).	61
5.2 Experimentos <i>In vivo</i>	64
5.2.1 Toxicidad letal	64
5.2.1.1 Determinación de la $CL_{50}$ - 96h	64
5.2.1.2 Determinación de la $CI_{50}$ - 96h	66
5.2.2 Inhibición de la Actividad de AChE a concentraciones subletales	68
5.2.3 Recuperación de la actividad de AChE	69
6. DISCUSION	72
7. CONCLUSIONES	82
8. BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS	97

## INDICE DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Principales plaguicidas organofosforados,	9
Tabla 2. Clasificación de los bioensayos de toxicidad.	22
Tabla 3. Marcadores biológicos ampliamente utilizados.	27
Tabla 4. Km de substratos utilizados (ATC, BTC y PTC).	51
Tabla 5. Registro de mortalidad a 96 h de exposición a metamidofos	65
Tabla 6. Determinación de $CL_{60}$ -96h de metamidofos sobre camarón blanco.	65
Tabla 7. Concentración inhibitoria media ( $CI_{60}$ ) del camarón blanco expuesto a metamidofos.	66
Tabla 8. Actividad de AChE en organismos colectados en el sistema lagunar Navachiste, Sinaloa (primer muestreo).	100
Tabla 9. Actividad de AChE en organismos colectados en el sistema lagunar Navachiste (segundo muestreo).	104

## INDICE DE FIGURAS

	pag.
Figura 1. Ciclo de vida del camarón.	6
Figura 2. Modo de acción de la inhibición de acetilcolinesterasa.	16
Figura 3. Muestra de músculo y ojos para la determinación de AChE.	35
Figura 4. Actividad de AChE en músculo en función del incremento de concentración con tres diferentes sustratos.	49
Figura 5. Actividad de AChE en ojo en función del incremento de la concentración con tres diferentes sustratos.	50
Figura 6. Efecto de la ESERINA sobre la actividad de AChE en músculo.	52
Figura 7. Efecto de la ESERINA sobre la actividad de AChE en ojo.	52
Figura 8. Efecto del BW284c51 sobre la actividad de AChE en músculo.	53
Figura 9. Efecto del BW284c51 sobre la actividad de AChE en ojo.	54
Figura 10. Efecto del iso-OMPA sobre la actividad de AChE en músculo	55
Figura 11. Efecto del iso-OMPA sobre la actividad de AChE en ojo	55
Figura 12. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de AChE en músculo expuesto a tres inhibidores.	56
Figura 13. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de AChE en ojo expuesto a tres Inhibidores.	57
Figura 14. Porcentaje de inhibición de AChE en músculo expuesto a tres estándares organofosforados.	59
Figura 15. Porcentaje de inhibición de AChE en ojo expuesto a tres estándares organofosforados.	60
Figura 16. Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad de AChE del músculo y ojo en presencia de metamidofos comercial	62
Figura 17. Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad de AChE del músculo y ojo en presencia de metamidofos técnico.	63

Figura 18. Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad de AChE del músculo y ojo en presencia de metamidofos estándar.	63
Figura 19. Porcentaje de inhibición de la AChE presente en músculo y ojo camarón blanco expuestos 96 h a metamidofos.	67
Figura 20. Porcentaje de inhibición de la actividad de AChE en músculo expuesto a concentraciones subletales de metamidofos y a diferentes tiempos de exposición.	68
Figura 21. Porcentaje de inhibición de la actividad de AChE en ojo expuesto a concentraciones subletales de metamidofos y a diferentes tiempos de exposición.	69
Figura 22. Porcentaje de recuperación de actividad de AChE en músculo durante el período de recuperación a 240 h.	70
Figura 23. Porcentaje de recuperación de actividad de AChE en ojo durante el período de recuperación a 240 h.	71
Figura 24. Estaciones de muestreo en la bahía de Navachiste, Sinaloa.	99
Figura 25. Actividad de AChE en camarón azul <i>Litopenaeus stylirostris</i>	101
Figura 26. Actividad de AChE en camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> .	102
Figura 27. Actividad de AChE presente en músculo de mojarra plateada.	103
Figura 28. Actividad de AChE en camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> colectado en el segundo muestreo	104
Figura 29. Actividad de AChE en organismos colectados en la estación del Huitusi.	105
Figura 30. Actividad de AChE en organismos colectados en la estación del Cerro Cabezón.	106

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACH<sub>E</sub></b>	Acetilcolinesterasa.
<b>ACH</b>	Acetilcolina.
<b>ATC</b>	Acetiltiocolina.
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza.
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials.
<b>BAM</b>	modelos de medición de comportamiento.
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterasa.
<b>BTC</b>	Butiriltiocolina.
<b>BW284c51</b>	1,5-bis (4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-uno dibromuro.
<b>ChAT</b>	Acetiltransferasa.
<b>ChE</b>	Colinesterasa.
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal media de una sustancia que es estimada a ser letal al 50% de los organismos de prueba.
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración que induce el 50% de inhibición en un proceso diseñado en una población expuesta.
<b>CONE</b>	Con etanol.
<b>CONA</b>	Con acetato de etilo.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico, el cual realiza funciones en la programación de los códigos genéticos dentro de las células.
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media de una sustancia que es estimada a ser letal al 50% de los organismos de prueba.
<b>DTNB</b>	5,5-ditio-bis (2-nitrobenzoico).
<b>DO</b>	Densidad optica.
<b>DE</b>	Desviación estándar.
<b>EPA</b>	Environment Protection Agency.
<b>ES</b>	Error estándar.
<b>FAO</b>	Food Alimentation Organization.
<b>ha</b>	hectárea.
<b>ISO</b>	International Organization for Standarization.

<b>Iso-OMPA</b>	tetraisopropilpirofosforamido.
<b>IA</b>	Ingrediente activo.
<b>Km</b>	constante de Michaelis.
<b>M</b>	Molar. Equivale a 1 mol de soluto en 1 litro de solución.
<b>mM</b>	milimolar. Equivale a $1 \times 10^{-3}$ Molar.
<b>MFO</b>	Oxidasas de función mixta. Enzima que cataliza reacciones entre un compuesto orgánico y oxígeno molecular, en donde un átomo del oxígeno de la molécula es incorporado dentro del compuesto orgánico y un átomo de la molécula de oxígeno es reducido a agua.
<b>mg</b>	miligramos.
<b>ml</b>	mililitros.
<b>ng</b>	nanogramo. Equivale a $1 \times 10^{-9}$ g.
<b>OF</b>	Organofosforados.
<b>OC</b>	Organoclorados.
<b>pH</b>	Logaritmo negativo de la actividad de iones de hidrógeno en equivalentes a gramos por litro.
<b>P-450</b>	Citocromo P-450.
<b>PTC</b>	Propioniltiocolina.
<b>ppm</b>	partes por millón.
<b>PARCOM</b>	París Comisión .
<b>Probít</b>	Probabilidad de una unidad obtenida de estandarizar el trazo de una distribución normal contra el logaritmo de la concentración o dosis de una sustancia cuando el grado de respuesta es medido.
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto.
<b>RTECS</b>	Registry Toxic of Effects Chemical Substancias.
<b>SINE</b>	Sin etanol.
<b>SINA</b>	Sin acetato de etilo.
<b>Vmax</b>	Velocidad máxima de reacción.
<b>µg</b>	microgramo. Equivale a $1 \times 10^{-6}$ g.
<b>µL</b>	microlitro. Equivale a $1 \times 10^{-6}$ l.
<b>c</b>	coeficiente de extinción molar.

## RESUMEN

La constante aplicación de productos químicos para el combate de plagas, está generando serios problemas de deterioro ambiental a nivel mundial. En el estado de Sinaloa se utilizan aproximadamente de 12,000 a 15,000 toneladas anuales de plaguicidas. Hoy en día, los insecticidas organofosforados son los plaguicidas más ampliamente utilizados en Sinaloa. En comparación con los plaguicidas organoclorados, los insecticidas organofosforados son menos persistentes, pero más tóxicos. El objetivo de este estudio fue el de evaluar los efectos de plaguicidas organofosforados sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) *in vitro* e *in vivo* de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Se caracterizó *in vitro* la colinesterasa (ChE) presente en músculo y ojo utilizando sustratos específicos. Los resultados muestran que las altas actividades de colinesterasa ocurrieron cuando se utilizó acetiltiocolina (ATC) y propioniltiocolina (PTC), mientras que la más baja actividad fue con butiriltiocolina (BTC). La actividad de colinesterasa en ojo de *Litopenaeus vannamei* fue más alta ( $35.36 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína) que en músculo ( $4.82 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína). Se calcularon las  $K_m$  en músculo y ojo en presencia de los sustratos (ATC, BTC y PTC). Los resultados indican mayor afinidad de la colinesterasa por ATC y PTC. Se evaluaron tres inhibidores específicos (sulfato de eserina, BW284c51 e iso-OMPA). Sulfato de eserina resultó ser el más potente inhibidor de AChE con un 90% y 99% de inhibición en músculo y ojo a una concentración de 0.01 mM. De tres insecticidas (metamidofos, malatión y diazinón), utilizados para evaluar la inhibición de AChE, el malatión resultó ser el más potente inhibidor con 92% de inhibición de AChE en ojo a una concentración de 0.0038 mg ml<sup>-1</sup>. Tres presentaciones de metamidofos (estándar analítico, grado técnico y comercial) fueron evaluadas, siendo el comercial y el grado técnico los que más inhibieron la actividad de AChE.

Se realizaron pruebas de toxicidad aguda, usando metamidofos grado comercial con camarón blanco en etapa juvenil, y la concentración letal media calculada fue

CL<sub>50</sub> – 96h de 1.67 mg l<sup>-1</sup> y la concentración inhibitoria media fue calculada en músculo (CI<sub>50</sub> – 96h, 0.798 mg l<sup>-1</sup>) y en ojo (CI<sub>50</sub> – 96h, 0.518 mg l<sup>-1</sup>). Camarones juveniles fueron expuestos a concentraciones subletales (0.125, 0.296 y 0.526 mg l<sup>-1</sup>) para evaluar la actividad de AChE en músculo y ojo. Los resultados indican que la inhibición de AChE es más alta en ojo que en músculo. Durante el experimento de recuperación, los organismos fueron alcanzando los niveles de AChE del control después de 10 días de estar en agua limpia, con excepción de la concentración de 0.526 mg l<sup>-1</sup>, los organismos no se recuperaron.



## ABSTRACT

The continuous application of agrochemicals for the combat of the pest control produces considerable environmental damage worldwide. The pesticides used in the state of Sinaloa reaches approximately 12000 –15000 tons per year. Nowadays, the organophosphorous insecticides are the most widely used pesticides in Sinaloa. In comparison with the organochlorine pesticides, the organophosphorous insecticides are less persistent, but more toxic. The objective of this study was to test the effects of organophosphorous pesticides on cholinesterase activity, both *in vitro* and *in vivo*, on white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The cholinesterase (ChE) present in muscle and eyes was characterized *in vitro* using specific substrates. The results showed that the highest activity of cholinesterase occurred when acetylthiocholine (ATC) and propionylthiocholine (PTC) were used as substrates, while butyrylthiocholine (BTC) recorded low activity. The activity of *L. vannamei* eyes cholinesterase in the substrate ATC ( $35.36 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  of protein) was higher than in muscle ( $4.82 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  of protein). The  $K_m$ 's calculated in muscle and eyes for the substrates ATC, PTC and BTC indicated higher affinities of ChE with ATC and PTC. Three specific inhibitors (eserine sulphate, BW284c51 and iso-OMPA) were evaluated as well. Eserine sulphate resulted the most potent AChE inhibitor, with 90 to 99% of inhibition in both muscle and eyes at 0.01mM. Three insecticides (methamidophos, malathion and diazinon) were used to evaluate the *in vitro* AChE inhibition. Malathion resulted the most potent inhibitor, producing 92 % of AChE inhibition in eyes at  $0.0038 \text{ mg ml}^{-1}$ . Three presentations of methamidophos insecticide (analytical standard, technical grade and commercial) were evaluated, being the commercial and technical grade the most potent AChE inhibitors .

Acute toxicity tests were performed using commercial-grade methamidophos with white shrimp juveniles and the lethal median concentration was calculated:  $CL_{50} - 96h$  of  $1.67 \text{ mg l}^{-1}$ . The median inhibitory concentration was calculated by determining AChE activity in muscle ( $CI_{50} - 96h$  of  $0.798 \text{ mg l}^{-1}$ ) and in eyes ( $CI_{50} - 96h$  of  $0.518 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Shrimp were also exposed to sublethal concentrations (0.125, 0.296 and 0.526 mg l<sup>-1</sup>) to evaluate AChE activity in muscle and eyes. The results indicates that AChE inhibition is consistently higher in eyes than in muscle. During a recovery experiment, organisms were able to reach control AChE levels after ten days in clean water, with exception of the concentration 0.526 mg l<sup>-1</sup>, where the organisms did not recover.

## 1. INTRODUCCION

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan a nuestro planeta, y surge cuando, por presencia cuantitativa o cualitativa de materia o energía, se produce un desequilibrio ambiental. Este término podremos definirlo también, de una manera más clara, como la adición de cualquier sustancia al medio ambiente, en cantidades tales, que cause efectos adversos en los seres humanos, animales, vegetales o materiales que son expuestos a dosis que sobrepasen los niveles que se encuentran regularmente en la naturaleza (Martínez y Rodríguez, 1997).

A diferencia de muchos contaminantes ambientales, los productos químicos como los utilizados en la agricultura, se producen para exterminar a uno u otro organismo plaga y son introducidos deliberadamente en el medio ambiente. La falta de especificidad de algunos plaguicidas y su irresponsable uso en algunas regiones han producido efectos secundarios no deseados en organismos no blanco incluyendo al hombre (Carvahlo y Hance, 1993).

Los contaminantes de origen químico más importantes aplicados en la agricultura, se pueden clasificar en fertilizantes y plaguicidas. Dentro de los plaguicidas; los herbicidas, insecticidas y fungicidas son los más utilizados y por lo tanto, representan mayor riesgo de contaminación para el ambiente. Recientemente, los insecticidas de mayor consumo son los compuestos organofosforados (OF), como el metamidofos, paratión, malatión, y el clorpirifos, que conjuntamente con los carbamatos y piretroides, han reemplazado gradualmente a los plaguicidas organoclorados por su fácil degradación y menor persistencia dentro del ambiente (Lundebye *et al.*, 1997; Jett *et al.*, 1999 y Jui-Hung *et al.*, 2000).

En general, el uso indiscriminado y la inadecuada aplicación de los plaguicidas puede ocasionar un alto riesgo de contaminación por estos compuestos, que pueden ser descargados a través de los drenes agrícolas y ríos, a estuarios y lagunas. Otro

origen, podría ser el transporte atmosférico originado por la aplicación aérea de plaguicidas. De esta manera, el viento contribuye transportando el plaguicida aplicado en los cultivos agrícolas cercanos al mar, a lugares alejados de los sitios de aplicación, como pueden ser lagunas, esteros y aguas costeras.

Los plaguicidas ya dentro del ambiente acuático ejercen un efecto tóxico sobre los organismos, que puede ser expresado en una variedad de respuestas o cambios a través de su comportamiento, fisiología, bioquímica, patobiología y morfología, además de cambios genéticos en estructuras celulares y alteraciones ecológicas a nivel comunidad (Waldichuk, 1985).

El principal efecto de los plaguicidas organofosforados, ha sido la neurotoxicidad y en casos extremos la mortalidad directa. El mecanismo de acción de estos insecticidas es inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), la cual altera la función nerviosa, por una acumulación de acetilcolina dentro de la membrana postsináptica (Lundebye *et al.*, 1997; Tusarová *et al.*, 1999).

Cualquiera que sea el mecanismo de acción, al destruir o reducir significativamente las poblaciones de algunas especies, puede alterar la estructura (riqueza de las especies, densidad biológica y diversidad) y el equilibrio funcional de un ecosistema (Carvahlo y Hance, 1993). Por esto, y por su carácter tóxico, deben ser estudiados cuidadosamente para definir la magnitud y tipo de impacto sobre el ambiente y la salud. Asimismo, es importante conocer su difusión y transformaciones en el ambiente, y su presencia en los tejidos vivos (Albert y Benítez, 1996).

Con el fin de estudiar el efecto tóxico de los contaminantes y de otros estresores ambientales en los organismos, se han evaluado las enzimas relacionadas con alteraciones metabólicas. La acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa son algunas de las enzimas que se han analizado en organismos acuáticos (Escartín y Porte, 1997, Dauberschmidt *et al.*, 1997 y Bellanguer *et al.*, 1998). La inhibición de estas enzimas se ha utilizado a nivel mundial, como biomarcador de contaminación de plaguicidas

organofosforados y carbamatos principalmente. Una ventaja importante de este tipo de estudios bioquímicos, es que al detectar una disminución en la actividad de estas enzimas en organismos acuáticos y aves, puede indicar y proveer una señal temprana de los efectos de contaminación originada por estos compuestos químicos (Payne *et al.*, 1994; Lari *et al.*, 1994; Fossi *et al.*, 1996; Walker, 1998 ; Nath y Kumar, 1999).

En México, la mayoría de los estudios son enfocados principalmente a la determinación cuantitativa y cualitativa de plaguicidas organoclorados y metales pesados (Páez-Ozuna y Tron-Mayén, 1996; Galindo *et al.*, 1997; Páez-Ozuna *et al.*, 1998) y organofosforados (Readman *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1996, Gonzalez-Farias *et al.*, 1997). Por lo tanto, es necesaria la evaluación de los efectos de plaguicidas OF, mediante la utilización de marcadores bioquímicos, como la cuantificación de la actividad de acetilcolinesterasa en organismos acuáticos. Mediante esta técnica, se puede conocer de manera temprana la presencia de plaguicidas OF y carbamatos, en menor tiempo y a un costo menor que mediante el análisis químico.

El estado de Sinaloa por su gran extensión territorial de aproximadamente 58, 092 km<sup>2</sup> (Olea, 1975), representa un Estado importante en producción y exportación de productos agrícolas a nivel nacional. Tan sólo en el ciclo 96/97, se sembraron 1, 375,845 hectáreas, lo que implica un incremento en la aplicación de plaguicidas para el combate de plagas que afectan los cultivos, respecto a años anteriores (INEGI, 1998).

Considerando que la mayoría de la agricultura está asentada en la planicie costera, y cuya actividad generó en 1998, aproximadamente 10,175 toneladas (INEGI, 1998), es de especial interés conocer el impacto de los agroquímicos mediante la utilización de biomarcadores bioquímicos, ya que, el camarón pudiera verse severamente afectado por la presencia de residuos químicos provenientes de los campos agrícolas y repercutir de una manera negativa sobre otra actividad que es de gran importancia económica en el estado de Sinaloa, como es la camaronicultura.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biología de la especie

Los camarones son crustáceos decápodos, que al igual que la mayoría de los organismos poseen mecanismos de defensa, que los protegen de efectos deletéreos de muchos compuestos desconocidos incluyendo los plaguicidas. La pesquería en nuestro país, está sustentada por organismos de la familia Penaeidae. Estos organismos constituyen uno de los principales recursos marinos de los Océanos Pacífico y Atlántico de EUA, México, Centro y Sudamérica, así como de otros mares tropicales y subtropicales del océano mundial (Ruiz, 1985).

En México, estos crustáceos se encuentran en las zonas bentónicas tropicales y subtropicales tanto del Océano Pacífico como del Atlántico. Las especies más importantes son: *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco), *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul), *Litopenaeus californiensis* (camarón café) y *Litopenaeus brevirostris* (camarón rojo) (Martínez, 1993).

En el Estado de Sinaloa las principales especies de camarón cultivado y capturado corresponden al camarón blanco y camarón azul. En 1999 se obtuvo en peso vivo un total de 31, 175 toneladas, correspondiendo 13, 369 ton al cultivo de estas especies, 5, 687 capturado en esteros y bahías y 12, 119 toneladas capturadas en mar abierto. Estos volúmenes de producción sitúan al Estado de Sinaloa en primer lugar a nivel nacional, en captura y cultivo de este crustáceo (INEGI, 1999).

#### **2.1.1 Morfología externa e interna**

El cuerpo de los camarones se divide en tres regiones: cefalotórax, abdomen y telson. Los apéndices del cefalotórax son: anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y periópodos. El abdomen está formado por seis segmentos y cinco pares

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biología de la especie

Los camarones son crustáceos decápodos, que al igual que la mayoría de los organismos poseen mecanismos de defensa, que los protegen de efectos deletéreos de muchos compuestos desconocidos incluyendo los plaguicidas. La pesquería en nuestro país, está sustentada por organismos de la familia Penaeidae. Estos organismos constituyen uno de los principales recursos marinos de los Océanos Pacífico y Atlántico de EUA, México, Centro y Sudamérica, así como de otros mares tropicales y subtropicales del océano mundial (Ruiz, 1985).

En México, estos crustáceos se encuentran en las zonas bentónicas tropicales y subtropicales tanto del Océano Pacífico como del Atlántico. Las especies más importantes son: *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco), *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul), *Litopenaeus californiensis* (camarón café) y *Litopenaeus brevisrostris* (camarón rojo) (Martínez, 1993).

En el Estado de Sinaloa las principales especies de camarón cultivado y capturado corresponden al camarón blanco y camarón azul. En 1999 se obtuvo en peso vivo un total de 31, 175 toneladas, correspondiendo 13, 369 ton al cultivo de estas especies, 5, 687 capturado en esteros y bahías y 12, 119 toneladas capturadas en mar abierto. Estos volúmenes de producción sitúan al Estado de Sinaloa en primer lugar a nivel nacional, en captura y cultivo de este crustáceo (INEGI, 1999).

#### **2.1.1 Morfología externa e interna**

El cuerpo de los camarones se divide en tres regiones: cefalotórax, abdomen y telson. Los apéndices del cefalotórax son: anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y periópodos. El abdomen está formado por seis segmentos y cinco pares

puesto el huevo) nacen las larvas denominadas nauplios. Estos nauplios presentan cinco subetapas con una longitud promedio de 0.50 mm y de anchura 0.20 mm. Posteriormente, se suceden diversos cambios morfológicos larvarios conocidos como protozoa, mysis y postlarva. En protozoa, presenta tres etapas por lo que en la última etapa alcanza una longitud promedio 2.59 mm, en mysis presenta igualmente tres etapas, en la etapa terminal alcanza una longitud de 4.3 mm, posteriormente 24 horas después entran en etapa postlarva a una longitud de 4.6 mm (Treece, 1985).

La segunda etapa se encuentra en las áreas de maternidad y crecimiento, que corresponden a bahías cerradas, lagunas costeras y sistemas estuarinos; en esta etapa los camarones juveniles adquieren hábitos bentónicos, distribuyéndose en una amplia gama de lugares de acuerdo a la especie.

La etapa de los adultos es generalmente el mar abierto. La profundidad a la que viven depende de la especie. Su distribución, tanto vertical como horizontal, esta determinada por la estación del año, principalmente debido a los cambios de temperatura (Martínez, 1993). Las tres etapas mencionadas anteriormente se muestran en la Figura 1.

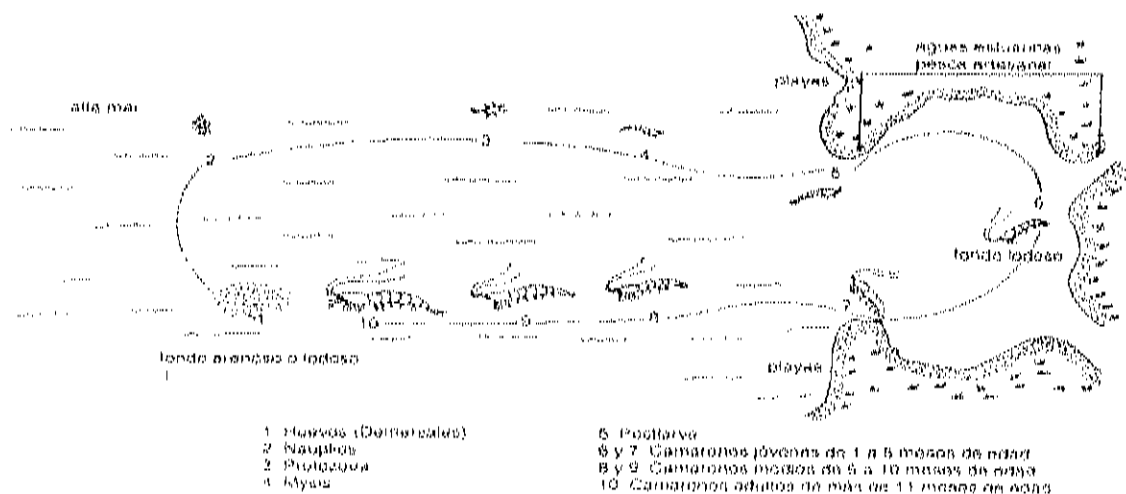


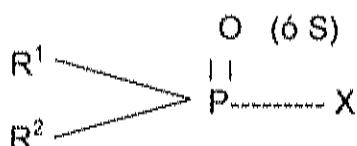
Figura 1 Ciclo de vida del camarón (Ruiz, 1985).



## 2.2 Plaguicidas Organofosforados

Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o interfieran con la producción agropecuaria y forestal por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieren con el bienestar del hombre y de los animales (CICOPLAFEST, 1998).

De acuerdo a WHO (1986), los plaguicidas se pueden clasificar conforme a su composición química en: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides entre los más importantes. Los plaguicidas organofosforados (OF) son normalmente ésteres, amidas o derivados tior del ácido fosfórico o fosfónico. Su fórmula general es la siguiente:



Donde  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  son usualmente grupos alquilo, ambos pueden ser enlazados directamente al fósforo (en fosfonatos), o enlazados vía -O-, o -S- (en fosfatos), o  $\text{R}^1$  puede ser enlazado directamente y  $\text{R}^2$ , enlazado uno de los grupos (fosfonatos). En fosforamidatos, el carbono de los fósforos es enlazado a través del grupo -NH. El grupo X puede ser cualquiera de la amplia variedad de grupos alifáticos, aromáticos o grupos heterocíclicos enlazando fósforos (usualmente -O-, o -S-). El átomo de la doble ligadura puede ser oxígeno o azufre. En general se pueden mencionar tres grupos principales, los fosfatos (sin átomos de azufre), los fosforotioatos (con un átomo de azufre) y los fosforoditoatos (con dos átomos de azufre).

Los plaguicidas OF, son relativamente solubles en agua, tienen un alto coeficiente de partición y baja presión de vapor, son comúnmente usados en la agricultura o ganado de todo el mundo para la protección de las cosechas o eliminación de ectoparásitos como sustitutos de plaguicidas persistentes como los organoclorados. Los plaguicidas OF son compuestos más tóxicos para los mamíferos y menos tóxicos para peces y más específicos que los organoclorados (Galgani y Bocquené, 1990), son menos persistentes y menos lipofílicos (Carvalho y Hance, 1993).

En los cultivos agrícolas del estado de Sinaloa, tres de los plaguicidas organofosforados que se utilizan en gran cantidad, para el combate de una variedad de plagas son el metamidofos, malatión y diazinón. El metamidofos es un plaguicida sistémico, su nombre químico es O,S-dimetil fosforamidotoato, su fórmula molecular es  $C_2H_6NO_2PS$ , presenta un peso molecular de 141.13, punto de ebullición igual a  $44.5^\circ C$ . Es hidrosoluble a  $20^\circ C$  más de  $2\text{ kg l}^{-1}$ , presenta una estabilidad a un pH de 3-8. Se hidroliza rápidamente a altas temperaturas, a  $40^\circ C$  el 50% se hidroliza a un pH 2. Es muy tóxico para mamíferos, aves, peces e invertebrados, además produce efectos teratogénicos y mutagénicos (The Royal Society of Chemistry, 1983).

El malatión es un OF no sistémico que se utiliza ampliamente en cultivos agrícolas y hortícolas, e incluso en el combate del mosquito en campañas realizadas por el sector salud. Su nombre químico es S-1,2-di (etoxicarbonil) etil O,O-dimetil fosforoditioato, su fórmula es  $C_{10}H_{10}O_6PS_2$  y su peso molecular es de 330.3. Es soluble en agua a  $145\text{ mg l}^{-1}$  a  $25^\circ C$ . Es estable en aguas saladas y dulces naturales con pH 5 - 7 (Derosa y Stara, 1988)

El diazinón al igual que los anteriores, es de amplio uso, por lo que representa también un riesgo de contaminación e incluso de intoxicación. Su fórmula es  $C_{11}H_{21}N_2O_3PS$ , presenta un peso molecular de 304.38. Su nombre químico es O,O-dietil-O-(6-metil-2-(1-metiletil)- 4 - pirimidinil), es poco persistente y muy tóxico para peces, aves y abejas (WHO, 1986; CICOPLAFEST, 1998).

En la Tabla 1, se mencionan algunos de los plaguicidas organofosforados de mayor uso en el combate de plagas para la protección de las cosechas.

Tabla 1. Principales plaguicidas organofosforados.

Tipo de organofosforados	estructura	nombre común
Fosfato	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ (\text{R-O})_2\text{-P-O-X} \end{array}$	diclorvos, monocrotofos, mevinfos, dicrotofos, fosfamidon, triazofos, tetraclorovinfos, naled etc.
O-fosforotioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ (\text{R-O})_2\text{-P-S-X} \end{array}$	amiton, omeotato, foxim, demeton-s-metil, vamidotion etc.
	$\begin{array}{c} \text{S} \\    \\ (\text{R-O})_2\text{-P-O-X} \end{array}$	clorpirifos, fenitrothion, diazinon, parathion, fention, temefos, tionazin etc.
Fosforditoato	$\begin{array}{c} \text{S} \\    \\ (\text{R-O})_2\text{-P-S-X} \end{array}$	malatión, etion, dimetoato, fosmet, Azínfos-metil y etil, metidation, Formotion, dioxation etc.
S-fosforotioatos	$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad / \\ \text{S} \quad \text{P-O-X} \\ / \quad \diagdown \\ \text{R} \quad \text{O} \end{array}$	profenofos, trifenofos
Fosforotioamidato	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{R-O-P-NR}_2 \\   \end{array}$	metamidofos
	S-alcali	
Fosfonato	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{RO} \quad \diagup \\ \quad \quad \diagdown \\ \text{R} \quad \quad \text{P-O-X} \end{array}$	butonate, triclorfen
Fosforamidatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ (\text{R-O})_2\text{-P-NR}_2 \end{array}$	cruformato, fenamifos y fostietan

(WHO, 1986).

### **2.2.1 Distribución y transporte ambiental**

En la distribución y transporte de los químicos, se conocen dos importantes mecanismos de transporte que son: transporte entremedio el cual el químico es transportado lejos o distante del origen de un medio ambiental. El transporte entremedios es conocido por transportar los químicos de un medio ambiental a otro.

El transporte entremedios es importante con relación a la movilidad del medio ambiente; que puede ser aire, agua y agua subterránea; este transporte toma lugar a través de mecanismos de advección y dispersión. La advección causa el viaje del químico de un lugar a otro como resultado del flujo del medio en el que esto ocurre. El transporte entremedios cambia en todos los medios, pero es más importante en el medio estacionario: como en sedimento y suelos (Leeuwen y Hermens, 1995).

La aplicación aérea de muchos plaguicidas ocasiona que se transporte entremedio del aire, el cual puede influir en su dispersión a lugares lejanos de la aplicación, pero en general, sólo pequeñas cantidades de estos organofosforados son transportadas por esta vía. (WHO, 1986). Muchos de los químicos organofosforados son de baja volatilidad, el diclorvos que es aún mucho más volátil que el malatión puede ser trasportado por medio del flujo de la corriente del aire (Vale, 1998).

### **2.2.2 Transformación**

Después de entrar al ambiente, los químicos son transportados por diferentes medios y pueden ser transformados en otros productos más tóxicos. El transporte puede ocurrir en el aire o en suelos o entre compartimentos entre aire y agua, aire y suelo, o agua y suelo. Los procesos de transformación en el ambiente involucran la degradación del químico (hidrólisis) o bacterias (biodegradación) (Leeuwen y Hermens 1995).

La principal ruta de degradación en el ambiente parece ser la hidrólisis, en suelos y ambientes acuosos. El tiempo de persistencia y la posibilidad de distribución en agua, puede ser influenciada por la intensidad de la luz y el pH. Muchos plaguicidas organofosforados son estables en un pH que puede ser encontrado en el ambiente (3 – 6). Así mismo, la influencia de factores microbiológicos en la degradación de los organofosforados en suelo y agua puede ser importante. Del mismo modo, las condiciones climáticas como la temperatura y la humedad; antes, durante y después de una aplicación del plaguicida puede influir en su persistencia (WHO, 1986)

Los químicos persistentes y no persistentes pueden ser transformados dentro del organismo, este proceso es llamado biotransformación. En muchos casos, la degradación es benéfica por que se forman sustancias de menor riesgo. Sin embargo, se conocen algunos ejemplos en el que algunos productos que se generan en el proceso de degradación resultan ser subproductos o metabolitos de mayor riesgo (WHO, 1986; Leeuwen y Hermens, 1995). Algunos metabolitos como el diazoxon y fenitrooxon causan una significativa inhibición sobre la AChE en los estados larvarios de camarón tigre, comparado con las formas tión (Rompas *et al.*, 1989).

Actualmente, es poca la información que se tiene sobre la acumulación de plaguicidas organofosforados en organismos, además de que esto es aún improbable que cantidades significantes de plaguicidas OF se acumulen en un organismo, que podría sobrevivir a los procesos hidrolíticos de consumo y digestión de estos plaguicidas, y ser acumulado a miembros superiores de la cadena alimenticia (Albert *et al.*, 1996).

Por otro lado, los OF utilizados sobre alimentos provenientes de los campos agrícolas, son de poca residualidad y usualmente los plaguicidas organofosforados son detectables después de cuatro semanas de la aplicación, sin embargo existen plaguicidas con un periodo de vida mayor, como el fenamifos y el leptofos, que presentan una actividad residual de varios meses (WHO, 1986).

### 2.2.3 Metabolismo

Los organismos en el ambiente, están expuestos a una gran variedad de compuestos químicos que son potencialmente dañinos, los cuales pueden ser consumidos por ellos afectando sus funciones normales. Cuando un compuesto químico dentro del organismo es convertido a otro (metabolito) se dice que se ha biotransformado. La biotransformación se define como la conversión de un xenobiótico a otro compuesto por medio de enzimas. Este proceso es llamado metabolismo.

Todos los organismos vivos poseen mecanismos de defensa que los protegen de los efectos deletéreos de pequeñas cantidades y muchos tipos de compuestos desconocidos, incluyendo los plaguicidas. Si una sustancia tóxica entra al organismo más rápidamente puede ser eliminada (con o sin prioridad del metabolismo), ésta puede acumularse hasta que la concentración del tóxico alcance un sitio de acción. Numerosos factores anatómicos fisiológicos y bioquímicos interactúan para determinar cuánto penetra de una sustancia en particular, cómo se distribuye a través del cuerpo, qué tan rápido, por qué ruta es metabolizado y por qué mecanismo es excretado.

Los procesos metabólicos son muy similares en plantas y animales. El destino de los plaguicidas u otros xenobióticos en un organismo es dependiente sobre un número de factores, como es la absorción, distribución o acumulación, disponibilidad de proteína, metabolismo y excreción. El papel que juegan cada uno de esos factores pueden ser afectados por la propiedades físico-químicas del químico, solubilidad de lípidos, grado de ionización, pH del cuerpo y presencia o ausencia de sitios reactivos sobre la molécula. Biológicamente las membranas son lipídicas, por lo que los lípidos más solubles y las moléculas menos ionizadas tienden a atravesar las membranas más rápidamente y completamente son absorbidos y llevados a sitios donde se acumulan, metabolizan o se excretan (Hart, 1977)

Existe gran evidencia que la principal respuesta de un organismo a destoxificar un xenobiótico orgánico y excretarlo rápidamente, es el metabolismo que emplea una

gran variedad de enzimas y normalmente son divididas en dos fases. La fase I o reacciones de funcionalización y la fase II o reacciones de conjugación. La fase I, no es por si misma la que destoxifica o crea productos que se incrementan con la solubilidad del agua, pero introduce grupos funcionales reactivos, tales como  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$  etc., dentro de la molécula del xenobiótico, de esta manera es preparada para la conjugación a una variedad de compuestos solubles en agua por las reacciones del metabolismo fase II.

La fase II, es la principal ruta real de destoxificación, y forma compuestos conjugados más solubles en agua, para posteriormente excretarlos del organismo por medio de la bilis y la orina (Hart, 1977; Livingstone, 1991).

Los procesos de eliminación y destoxificación pueden ser divididos de acuerdo a la velocidad de las reacciones metabólicas, muchos plaguicidas organofosforados son degradados de una manera más rápida, por tres distintas reacciones de biotransformación que involucran a las oxidasas de función mixta (MFO), hidrolasas y transferasas.

Las oxidasas de función mixta (MFO) o también conocidas como mono-oxigenasas, están asociadas al retículo endoplasmático, especialmente en hepatocitos de animales. Estas enzimas son capaces de insertar uno de dos átomos de oxígeno de una molécula de oxígeno dentro de un substrato apropiado, R-H. El otro átomo de oxígeno eventualmente forma parte de una molécula de agua. Dentro del hígado, aparece una gran cantidad de enzimas, siendo los citocromos P-450 las más conocidas. Dentro de las reacciones de eliminación más importantes, están la desulfuración oxidativa, N-desalquilación oxidativa, O-desalquilación oxidativa las cuales convierten triésteres a diésteres, para el proceso de destoxificación (Hassall, 1990).

Las hidrolasas y su función de hidrolizar en las uniones de tipos ester anhidridos ácidos es bien conocida. Los diésteres monobásicos y sus derivados son principalmente excretados a través de metabolitos urinarios de plaguicidas

organofosforados. Las enzimas conocidas como A-esterasas o fosforil fosfatasas están generalmente distribuidas en tejidos de mamíferos, como en hígado, plasma intestino etc., pero éstas son menos abundantes en aves y no están presentes en algunos insectos. La hidrólisis del ácido carboxílico en enlaces del tipo éster y enlaces carboxilamida en plaguicidas organofosforados pueden ser catalizadas por carboxilesterasa (B-esterasas), esto ocurre ampliamente en tejidos de mamíferos. como ejemplo, el malatión contiene dos uniones de éster carboxílico, y es el plaguicida organofosforado que más se conoce que es hidrolizado por esta vía (WHO, 1986).

Las transferasas son las únicas enzimas que cuando reaccionan con plaguicidas organofosforados del tipo triésteres involucran al glutatión. El glutatión es un tri péptido que contiene residuos de glicina, cisteína y ácido glutámico. Esto es importante con relación a la degradación de plaguicidas que involucran reacciones glutatión-S-transferasas, el cual es requerido como substrato por un número de enzimas transferasas presentes en la fracción soluble celular, en hígado y algunos otros tejidos de mamíferos (Hassall, 1990). La conjugación de glutatión con compuestos activos, es catalizada por al menos diez diferentes glutatión-S-transferasas, esta es una importante ruta de eliminación de esos compuestos. Después de la conjugación con glutatión, el conjugado es más frecuentemente hidrolizado a cisteína la cual es excretada rápidamente vía orina (WHO, 1978).

#### **2.2.4 Modo de acción**

Los compuestos OF son solubles y su mecanismo de acción es la inhibición reversible de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). El fenómeno ocurre con la interrupción de la transferencia colinérgica de los impulsos nerviosos por una acumulación de acetilcolina sobre la sinapsis colinérgica. La inhibición de AChE por inhibidores organofosforados toma lugar por el enlace en el centro activo de la enzima. Los procesos de inhibición suceden en dos pasos. En el primero paso, el inhibidor está enlazado a la enzima por enlaces no covalentes. Este complejo inhibidor-enzima es



reversible. En el segundo paso, el átomo de oxígeno de la serina es fosforilado covalentemente. La AChE fosforilada es convertida dentro de una forma dealquilada por agua a un grupo OR enlazado al sitio estereotico del centro activo de la AChE (Tusarová *et al.*, 1999) Cuando los OF actúan inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa, se generan gran cantidad de impulsos a las células efectoras y esta estimulación continua causa alteraciones fisiológicas, llegando inclusive a provocar la muerte (CICOPLAFEST, 1998)

La recuperación de actividad de AChE en organismos que sobreviven a los efectos agudos depende de la capacidad de recuperación de cada organismo, de la lenta defosforilación del sitio inhibido y de la síntesis de nueva AChE (Peakall, 1992). El modo de acción de inhibición de esta enzima y su recuperación se muestra en la Figura 2.

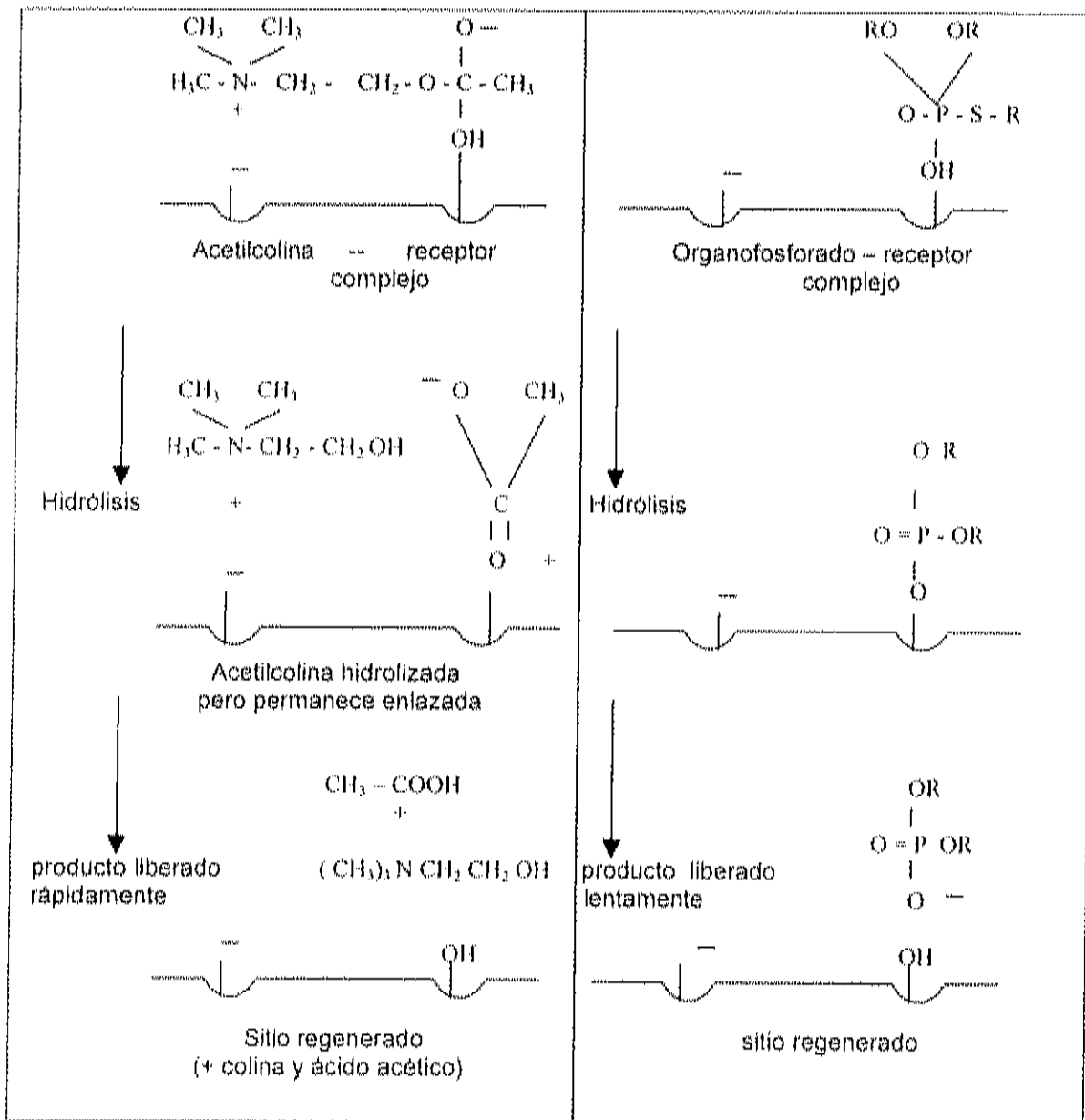


Figura 2. Modo de acción de inhibición de acetilcolinesterasa (Peakall, 1992).

### 2.2.5 Toxicidad

El concepto de tóxico, es definido como cualquier sustancia (pura o combinada) o efluente que al entrar en contacto con el organismo produzca daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición. Toxicidad es el efecto adverso que produce un tóxico (NOM-074-ECOL-1994). Si la toxicidad es aguda, en el término está implícita la muerte del organismo expuesto a causa del deterioro producido por la sustancia tóxica. Si la toxicidad es crónica, podrá sobrevivir hasta que se rebase el límite de su capacidad homeostática (Espina y Vanegas, 1996)

Los insecticidas organofosforados (OF) a pesar de su gran toxicidad se han aplicado considerablemente desde los años 70's. En general, el incremento ha sido menor en los años 80's, sin embargo, nuevas formulaciones y usos han sido introducidos al mercado tanto internacional como nacional. El diazinón, malatión, metamidofos y el paratión son algunos insecticidas ampliamente utilizados, no obstante pocos de ellos han sido evaluados con la finalidad de conocer su efecto tóxico sobre organismos no blancos.

El efecto tóxico de insecticidas OF, depende en gran medida a su estructura química, cantidad del plaguicida y del tiempo de exposición. En algunos casos los emulsionables que son solventes orgánicos o compuestos relacionados presentes en los concentrados o en formulaciones de plaguicidas pueden incrementar la toxicidad del producto químico (Scott *et al.*, 1987). El efecto tóxico de los organofosforados se ve mayormente reflejado en organismos benéficos para el hombre, los cuales pueden verse afectados por cualquiera de las tres vías de absorción (ingestión, inhalación y vía cutánea) (CICOPLAFEST, 1998). Sin embargo, los organismos no blancos también son afectados enormemente.

Este grupo de compuestos es relativamente de corto tiempo de vida en el ambiente, no se bioacumulan o biomagnifican, por lo que, no ocasionan serios problemas en organismos, aunque los plaguicidas organofosforados tiene una

uniformidad relativamente bien conocida de sus efectos sobre la variedad de organismos. Las concentraciones seguras de plaguicidas organofosforados, han sido estimadas a través de estudios de toxicidad, por ejemplo los insecticidas clorpirifos y malatión son químicos muy tóxicos para organismos no blanco. Tagatz *et al.*, (1982) mencionan una  $CL_{50} - 96h$  del clorpirifos en seis especies de peces estuarinos que fluctúan de 0.0017 a 0.136  $mg\ l^{-1}$ , mientras que para cinco diferentes crustáceos la  $CL_{50} - 96h$ , oscila entre 0.000035 a 0.0052  $mg\ l^{-1}$ . Por su parte, el malatión ocasionó un 50 % de mortalidad en camarón *Palaemonete pugio* a una concentración de 0.0084  $mg\ l^{-1}$ , comprobando con esto la gran toxicidad de los mencionados insecticidas OF, además de que la toxicidad aguda de esos compuestos varía ampliamente en las especies acuáticas. (Livingston, 1977).

Comparando la gran cantidad de plaguicidas que salen al mercado, sólo pocos compuestos organofosforados han sido probados para evaluar su efecto tóxico sobre los crustáceos, de tal manera, que esas pruebas han mostrado que aproximadamente la toxicidad es de 1000 veces mayor para camarones que otro tipo de plaguicidas (Couch, 1979). Los camarones peneidos han presentado mayor sensibilidad que los peces y moluscos a compuestos organofosforados.

Uno de los plaguicidas organofosforados que más ha sido evaluado, es el malatión. Este producto se aplica directamente sobre la superficie de las aguas para el control del mosquito, afectando de esta manera a los organismos acuáticos, y además ejerciendo estrés sobre las funciones más sofisticadas y exhaustivas de adaptabilidad de tales organismos. Este producto químico es muy tóxico para *Daphnia magna* ya que se necesita 0.003  $mg\ l^{-1}$  para matar el 50% de organismos expuestos (Livingston, 1977).

Por otro lado, en una aplicación aérea con malatión sobre humedales inundados en Texas US, (Conte y Parker, 1975), observaron 14 a 80% de mortalidad en camarón blanco y café, que fueron colocados en cajas previos a la aplicación del compuesto químico. Dichos autores mencionan que este químico no debe ser aplicado cerca de áreas donde se cultive camarón.

El metamidofos con efectos parecidos al malatión, es clasificado por la EPA como un compuesto Clase I, y es conocido a nivel mundial como un producto tóxico muy peligroso (Meister, 1995). Las formulaciones comerciales disponibles incluyen el concentrado soluble, concentrado emulsificable, polvo, granulado y concentrado miscible en agua. Generalmente el metamidofos no es considerado fitotóxico.

El metamidofos es altamente tóxico vía oral, la dosis oral media ( $DL_{50}$ ) para ratas es de 16 y 21 mg/kg de peso para hembra y macho respectivamente, 30 a 50 mg/kg de peso para puercos y de 10 a 30 mg/kg para conejos. La dosis dermal media en ratas es de 50 mg/kg de peso y 118 mg/kg de peso para conejos. El metamidofos es rápidamente absorbido a través del estómago, pulmón y piel. Este producto químico produce efectos reproductivos, teratogénicos, mutagénicos. En humanos el efecto del químico ocasiona una disminución en la cantidad del esperma (RTECS, 1990).

En aves, el efecto tóxico del metamidofos también ha sido estudiado y se ha observado que es muy tóxico. Hay referencia en que la  $DL_{50}$  oral de codornis fue de 8 a 11 mg/kg (Meister, 1995).

El metamidofos en agua tiene una vida media de 309 días a un pH 5.0, 27 días a pH 7.0 y tres días a un pH 9.0. Este químico se degrada en presencia de la luz y tiene una vida media de 90 días en agua a un pH 5.0 cuando se expone en presencia de luz. Pero aún en pequeñas cantidades en cuerpos acuáticos, puede ocasionar serios problemas en hidrobiontes en general (EPA, 1989).

En organismos acuáticos la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) del metamidofos para truchas es de 25 a 51 mg l<sup>-1</sup>, 46 mg l<sup>-1</sup> para guppies, 100 mg l<sup>-1</sup> en carpas y 100 mg l<sup>-1</sup> para pecesillos de color (Meister, 1995). Los crustáceos (*P. stylirostris*) son más sensibles que los peces, estos crustáceos resultaron ser más susceptibles al metamidofos en etapa nauplio, que protozoa y mysis (Juárez y Sánchez, 1989)

Juárez y Sánchez (1989), en un bioensayo estático con recambio diario, evaluaron la toxicidad aguda del metamidofos sobre larvas de camarón azul (*L. stylirostris*) en etapa de nauplio. La  $CL_{50} - 24h$  determinada fue de  $10 \text{ ng l}^{-1}$ , en protozoa de 85 y en mysis fue de  $160 \text{ ng l}^{-1}$ . A pesar de ser un producto catalogado como moderadamente tóxico, ocasionó un efecto letal a pequeñas concentraciones. Los autores concluyen que este producto organofosforado es altamente tóxico y que a concentraciones muy bajas podría afectar las poblaciones de crustáceos de cualquier sistema estuarino.

La mayoría de los plaguicidas organofosforados poseen una elevada toxicidad para cualquier organismo acuático y para aves. Por lo general, en las aves intoxicadas no se detectan residuos de estos plaguicidas, pero sí, una disminución en los niveles de acetilcolinesterasa en el cerebro. Por último, los efectos tóxicos y síntomas de intoxicación aguda por organofosforados en los mamíferos son similares a los que sufre el ser humano (Albert *et al.*, 1996).

### 2.3 Bioensayos de toxicidad

Se entiende como bioensayo, al ensayo en que un tejido, organismo o grupo de organismos vivos se usan como reactivo para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa cuya actividad se desconoce (FAO, 1981).

Los bioensayos de toxicidad, son herramientas insustituibles en la determinación de la toxicidad acuática y en el establecimiento de criterios y normas que regulen el ingreso al ambiente de sustancias químicas, sin perjuicio para los ecosistemas y por ende la salud humana. El principal objetivo de estas pruebas es determinar experimentalmente las concentraciones y condiciones que son seguras para el desarrollo adecuado de los organismos de prueba (Martínez-Jerónimo, 1991).

La finalidad de los bioensayos es variada, existiendo bioensayos de regulación legal de efluentes, bioensayos para establecer criterios de calidad de agua, para vigilar las áreas de descarga, organolépticos, de bioestimulación y bioensayos para proteger los niveles tróficos superiores. La finalidad de éste último tipo de bioensayo es determinar las sustancias que se acumulan en los organismos marinos, los resultados que arrojan estos ensayos pueden utilizarse para establecer normas para la protección de la salud pública (FAO, 1981).

Una manera de evaluar el efecto tóxico de un efluente industrial o de alguna sustancia química cuya toxicidad se desconoce, es mediante la realización de bioensayos agudos, ya que éstos nos permiten obtener una idea de su impacto sobre los organismos expuestos en cortos periodos de exposición (de 48 a 96 h). Los resultados de la toxicidad aguda son reportados en términos de concentración letal media (CL<sub>50</sub>).

En experimentos con organismos vivos, se debe considerar factores de gran importancia como son; el tamaño de muestra, aclimatación de los animales y el mantenimiento de las constantes ambientales. Muchos autores han establecido esas condiciones para que un bioensayo de toxicidad tenga mayor validez. Respecto al tamaño de muestra se utiliza normalmente un número de 10 organismos por concentración y de 6 organismos en casos de especies raras o escasas. Un número arriba de 20 organismos por concentración incrementa la exactitud del resultado final.

El rango de concentraciones debe seleccionarse en base a resultados preliminares, investigadores recomiendan que se consideren 6 concentraciones y su respectivo control como mínimo y las concentraciones a utilizar en el bioensayo de toxicidad deben de ser espaciadas logarítmicamente. La aclimatación de los animales de prueba es también importante por lo que un período de 2 a 3 semanas de aclimatación es suficiente para contrarrestar el estrés ocasionado por el transporte y manejo de los organismos. Por último, las condiciones ambientales durante el experimento son de gran importancia, ya que la toxicidad de muchos químicos es influenciada por condiciones ambientales tales como el pH, temperatura, oxígeno

disuelto y salinidad, por tal motivo es relevante que las variables ambientales deban ser monitoreadas regularmente y de ser posible controladas rápidamente (Abel y Axlak, 1991).

### 2.3.1 Tipos de bioensayos

Tabla 2. Clasificación de los bioensayos

Por su Efecto	Al tiempo de duración	Por su Aplicación	Al tipo de tratamiento	Al número de especies	Por el lugar de realización
Agudos	Corta	Estáticos	Químicos específicos	monoespecíficos	<i>In vitro</i>
Subcrónicos	Intermedia	Estáticos con Renovación	Mezcla de tóxicos	multiespecíficos	<i>In situ</i>
Crónicos	Larga	De flujo Continuo	Efluentes complejos	microecosistemas	<i>In vivo</i>

fuelle: Martínez-Jerónimo, 1991

A nivel mundial, existe bastante información sobre la realización de bioensayos de toxicidad, los cuales fueron hechos inicialmente con mamíferos e invertebrados terrestres. Actualmente se utilizan técnicas estandarizadas utilizando inclusive, especies estuarinas y marinas para evaluar la toxicidad de plaguicidas. Dentro de estas especies tenemos a los rotíferos (*Brachionus plicatilis*), crustáceos; copépodos (*Acartia tonsa*), camarón de mar (*Artemia salina*) y misidos (*Daphnia magna*) y finalmente bivalvos como ostras (*Crassostrea gigas*) y mejillones (*Mytilus edulis*). El uso de estas especies en la realización de bioensayos es generalmente fomentada por organizaciones como la "American Society for Testing and Materials" (ASTM), "US Environment Protection Agency" (EPA), "Paris Comission " (PARCOM) y la "International Organization for Standarization" (ISO) con la finalidad de incrementar la comparabilidad de resultados entre laboratorios e incrementar la existencia de bases de datos tóxico-biológicos de esas especies (Calow, 1993).



## 2.4 Colinesterasas

Las enzimas son proteínas especializadas para catalizar reacciones biológicas, éstas son las biomoléculas más extraordinarias por su gran especificidad y poder catalítico. Las colinesterasas representan a una subclase de esterasas "B" caracterizadas por la presencia de un sitio aniónico, así como un sitio activo (esterasa). Los colinésteres, son sustratos para las colinesterasas, vinculando ambos sitios activos. Los dos tipos de colinesterasas ampliamente reconocidas son: las Acetilcolinesterasas (AChEs) y las Butirilcolinesterasas (BChEs) (Walker y Thompson 1991).

Los compuestos organofosforados son los principales sustratos de las esterasas las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el reino animal. Aldridge (1953), propuso una clasificación de esterasas; las que son hidrolizadas por compuestos organofosforados (OF) son llamadas esterasas A y las que son inhibidas por OF son llamadas esterasas B. Tanto los plaguicidas OF como los carbamatos inhiben las esterasas B, estas incluyen las colinesterasas, las carboxilesterasa y las esterasas neurotóxicas (NTE). La inhibición de estas enzimas se lleva a cabo mediante la unión en el centro activo de la enzima (OH- serina 203) Walker y Thompson (1991).

Las colinesterasas se subdividen en dos grupos, las acetilcolinesterasas o verdaderas y las butirilcolinesterasas o pseudocolinesterasas. Las acetilcolinesterasas (AChE), hidrolizan preferentemente acetiltiocolina (ATC) como sustrato y son extremadamente sensibles a la inhibición por sulfato de eserina. Las butirilcolinesterasa, en cambio, hidrolizan la butiriltiocolina (BTC) como sustrato y son inhibidas selectivamente por iso-OMPA (tetrakisopropilpirofosforamido) (Habig y Di Giulio, 1991).

En la caracterización de la colinesterasa es importante conocer en cual substrato se determina una mayor actividad enzimática, así como también la concentración óptima del mismo. En la cinética de cualquier enzima, se sabe que en toda reacción catalizada por enzimas la velocidad de la reacción aumenta proporcionalmente respecto a la concentración del substrato, al seguir aumentando la concentración del substrato la velocidad de reacción no aumenta ya proporcionalmente, y llega a alcanzar una situación en la que aumentos importantes en la concentración del substrato no modifican la velocidad de reacción. Esto se fundamenta en la hipótesis propuesta por Michaelis (complejo enzima-substrato).



Donde E es la enzima, S el substrato, ES el complejo enzima substrato y P los productos de reacción.

La curva que se obtienen en las cinéticas enzimáticas muestra una curva del tipo hipérbola rectangular, la cual presenta una velocidad límite o velocidad máxima que es el valor que trata de alcanzar la curva a medida que se aumenta el substrato. El punto de importancia especial es el que en la mitad de la velocidad límite le corresponde una concentración específica del substrato; esta concentración de substrato se representa habitualmente como  $K_m$  y se denomina constante de Michaelis, por lo tanto, es la concentración del substrato con la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima de reacción. En términos generales una  $K_m$  elevada implica poca o escasa afinidad enzima - substrato; por el contrario, si presenta una  $K_m$  pequeña significa que la enzima tiene gran afinidad por el substrato (Stryer, 1988).

### 2.4.1 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que hidroliza a la acetilcolina (ACh) en colina y acetato. La ACh es un neurotransmisor localizado en el sistema nervioso central y del sistema nervioso autónomo, en las terminales de las fibras posganglionares de las uniones neuromusculares. Existen dos tipos de AChE en el cuerpo humano, estos tipos difieren entre sí en cuanto a su localización en los tejidos, afinidad por los sustratos y función fisiológica. El tipo "e", eritrocitaria o específica, la cual se encuentra localizada en las neuronas colinérgicas (dentritas, pericarion y axones) y en la sinapsis ganglionares de la estructura neuromuscular del organismo y en los eritrocitos. La del tipo "s", pseudocolinesterasa; pequeñas concentraciones de este tipo de enzima se encuentran presentes en el sistema nervioso central y periférico, prácticamente en todos los tejidos. También se encuentra presente en el plasma e hígado (Jeyaratnam y Maroni, 1994).

Se ha postulado que en las enzimas tipo "E" existen unos 50 sitios de reconocimiento en la molécula de AChE en mamíferos, en donde puede enlazarse un sustrato potencial de los cuales dos son de gran importancia, el aniónico y el activo en donde se encuentra el residuo hidroxílico de la ser 203 (requerimientos de especificidad y sensibilidad Sussman *et al.*, 1991).

En organismos acuáticos las enzimas tales como las colinesterasas, son divididas en dos clases: a) la acetilcolinesterasa (AChE) conocidas como enzima verdaderas, éstas son encontradas en tejido nervioso y en sangre. b) La segunda clase son las butirilcolinesterasas (BChE) comúnmente denominadas como pseudocolinesterasas, estas son esterasas inespecíficas y se encuentran en hígado y plasma de vertebrados. (Habig y Di Giulio, 1991).

### 2.4.2 Marcadores biológicos

A nivel mundial se ha confirmado la utilidad de la AChE como marcador biológico en estudios de campo, para determinar el impacto ambiental producido principalmente por plaguicidas organofosforados y carbamatos (Payne *et al.*, 1996; Stien *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999).

Un biomarcador puede ser definido como una respuesta bioquímica o celular que puede ser medida y que indica que el organismo ha sido expuesto a un químico o estresores antropogénicos (Shugart *et al.*, 1992).

Los primeros estudios sobre el uso de enzimas como marcadores biológicos fueron realizados a principios de los años 70's (Payne y Penrose, 1975; Kurelek *et al.*, 1977). El estudio de indicadores biológicos de estrés por medio de la evaluación de efectos a nivel fisiológico, bioquímico y celular o conductual, permite determinar los efectos de xenobióticos a nivel organismo, antes de que se manifiesten a nivel poblacional o de comunidad (Thomas, 1990).

Los marcadores biológicos se clasifican en indicadores de exposición a contaminantes ambientales, indicadores de efecto producidos por éstos e indicadores de susceptibilidad a los compuestos tóxicos. Entre los primeros se incluye el daño e interferencia provocado por los contaminantes, en procesos mediados por las enzimas, así como los efectos deletéreos a nivel genético, sobre el DNA. Entre los marcadores de efecto se engloban todos aquellos que se manifiestan en deterioro de la condición fisiológica (salud) del organismo. Los marcadores de susceptibilidad indican "diferencias individuales o poblacionales que afectan las respuestas ante los factores del medio, independientemente de la exposición a los contaminantes en estudio". (Koeman, 1991).

En la Tabla 3, se muestran algunos marcadores biológicos ampliamente utilizados.

Tabla 3. Marcadores biológicos ampliamente utilizados

Inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE)	provoca disturbios del sistema nervioso La inhibición es causada por organofosforados y carbamatos.
Inhibición del ácido Aminolevulínico	afecta la síntesis de la hemoglobina se ha relacionado con la concentración de plomo en el organismo.
Inducción de citocromo P450	causada por diferentes sustancias endógenas y exógenas se ha relacionado con la exposición compuestos PAHs o PCBs.
Metalotioneínas	induce la depresión de la exposición a metales.

(Escartín, 1999).

El estudio de las enzimas, específicamente la acetilcolinesterasa y su inhibición por insecticidas organofosforados, ha sido propuesto ampliamente para evaluar el impacto de estos contaminantes sobre organismos acuáticos (Coppage y Matteus, 1974; Day y Scott, 1990; Bocquene y Galgani, 1991; Galgani *et al.*, 1993; Kuhn y Streit, 1994; Depledge y Fossi, 1994; Escartín y Porte, 1996, 1997).

Los invertebrados acuáticos se han utilizado rutinariamente como indicadores, notablemente los organismos béntonicos son más sensibles a anticolinesterasas que los vertebrados. Los invertebrados son cuantitativamente mucho más numerosos y son componentes importantes de las cadenas alimenticias acuáticas y terrestres. Por lo tanto, una significativa reducción en las poblaciones de invertebrados podría tener importantes consecuencias ecológicas y económicas (Edwards y Fisher, 1991).

Entre los invertebrados, el camarón rosa (*Penaeus duorarum*) es considerado un organismo indicador de contaminación por organofosforados. Este organismo mostró un 75% de inhibición de AChE a concentraciones letales de malatión. Este nivel de inhibición fue similar a los reportados para cuatro especies de peces, expuestos a malatión (Edwards y Fisher, 1991).

Algunos autores mencionan a los crustáceos como los mejores candidatos para el monitoreo de plaguicidas organofosforados y carbamatos, ya que presentan una mayor sensibilidad a sustancias antropogénicas que los peces.

Day y Scott (1990) mencionan que una significativa inhibición en la actividad de la AChE en peces podría ser detectado a altas concentraciones, por lo que los peces no son buenos candidatos para el monitoreo de plaguicidas organofosforados. Sin embargo, Chin y Sudderuddin (1979), mencionan que un 70 a 80 % de inhibición de AChE en cerebro causó una mortalidad inminente en carpa común (*Cyprinus carpio*) expuesto a metamidofos.

Por otro lado, Coppage y Matheuus (1974) encontraron una inhibición del 70 al 96% en varias especies de peces y en camarón rosa expuestos a cortos períodos de tiempo a plaguicidas organofosforados. Ellos concluyeron que la medición de la actividad de la AChE podría ser útil para determinar las causas de mortalidades de organismos en el ambiente acuático.

Por los problemas de mortalidad en peces y crustáceos generados en sistemas acuáticos, son más los estudios realizados en etapas tempranas que en preadultas de especies que representan un alto valor comercial. Por ejemplo, se estudió el efecto tóxico del clorpirifos y malatión, sobre el camarón (*Palaemonetes pugio*) en etapas embrionarias (I a VII), dicho estudio, sólo presentó significancia en la inhibición de AChE ( $p \leq 0.05$ ) en la etapa VII para ambos plaguicidas. Los autores mencionan que las etapas embrionarias fueron menos sensibles que las etapas larvarias y adultas en bioensayos de toxicidad (Shannon *et al.*, 2000). Estos resultados indican que estos

organismos (no blancos), son muy sensibles a estos plaguicidas, lo cual podría tener consecuencias ecológicas desde estadios tempranos.

Srinivasulu y Ramana (1988) determinaron los niveles de AChE en tejido nervioso de camarón *Metapenaeus monoceros*, expuesto a 0.4 y 1.2 ppm de fosfamidon durante 48 h, ellos encontraron que la inhibición en la actividad de AChE fue de 28% y 53% respectivamente, mientras que a una exposición de metilparatión de 0.04 ppm la inhibición de AChE fue de 34% y a 0.12 ppm del 63%, a pesar de que las concentraciones del metilparatión fueron 10 veces menores que las de fosfamidon, el efecto de inhibición fue mayor, lo que se puede mencionar que la toxicidad depende en gran medida de la estructura química del plaguicida.

En un estudio de campo con crustáceos (*Procambarus clarkii*), colectados en canales de irrigación expuestos a una concentración de 200  $\mu\text{g l}^{-1}$  de fenitrotión se detectó una inhibición del 55%. Por lo que se recomienda que la medición de la actividad de AChE en músculo de este organismo puede ser usado para detectar la exposición de plaguicidas organofosforados ( Escartín y Porte, 1996).

Otros estudios comparan la actividad entre dos enzimas relacionadas con la colina. Scaps *et al.*, (1997), observaron que en poliquetos (*Nereis diversicolor*) la colina acetiltransferasa (ChAT), no fue modificada significativamente por organofosforados y carbamatos, mientras que la actividad de AChE sí fue inhibida a mayor tiempo en OF, que en carbamatos. Los autores concluyen que la ChAT no es una enzima blanco para estos plaguicidas y no debe ser usada para futuros estudios de toxicidad, mientras que la AChE sí es una enzima blanco de OF y carbamatos.

Como puede observarse, hay numerosos estudios a nivel mundial en los cuales la medición de la actividad de AChE en invertebrados acuáticos ha sido recomendada como una herramienta indicadora de contaminación por plaguicidas OF. En muchos casos, estos organismos son extremadamente útiles porque pueden responder a concentraciones subletales de tóxicos y así, proveen una indicación temprana de contaminación ambiental. Day y Scott (1990), mencionan que un 20 % de inhibición de

AChE, es indicativo de exposición a plaguicidas organofosforados y que un 50% representa un posible riesgo de mortalidad.

En México, la información relacionada al impacto de la contaminación por plaguicidas es muy escasa. Específicamente en Sinaloa que es un estado con gran actividad agrícola, las investigaciones se han limitado a cuantificar los niveles de plaguicidas organoclorados(OC), organofosforados (OF) y metales pesados (Readman *et al.*, 1992; Carvalho, *et al.*,1996; Páez-Ozuna y Tron-Mayén, 1996; Galindo *et al.*, 1997; Páez-Ozuna *et al.*,1998). Esto ilustra la necesidad de realizar a nivel laboratorio y campo, estudios ecotoxicológicos mediante la realización de bioensayos de toxicidad y de cuantificación de actividades enzimáticas como la (AChE). Esto con la finalidad de poder evaluar los daños ocasionados por los plaguicidas OF de manera temprana y detectar su presencia en organismos que habitan en los ecosistemas acuáticos, antes de que los efectos ocasionados por los plaguicidas sean irreversibles.



### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

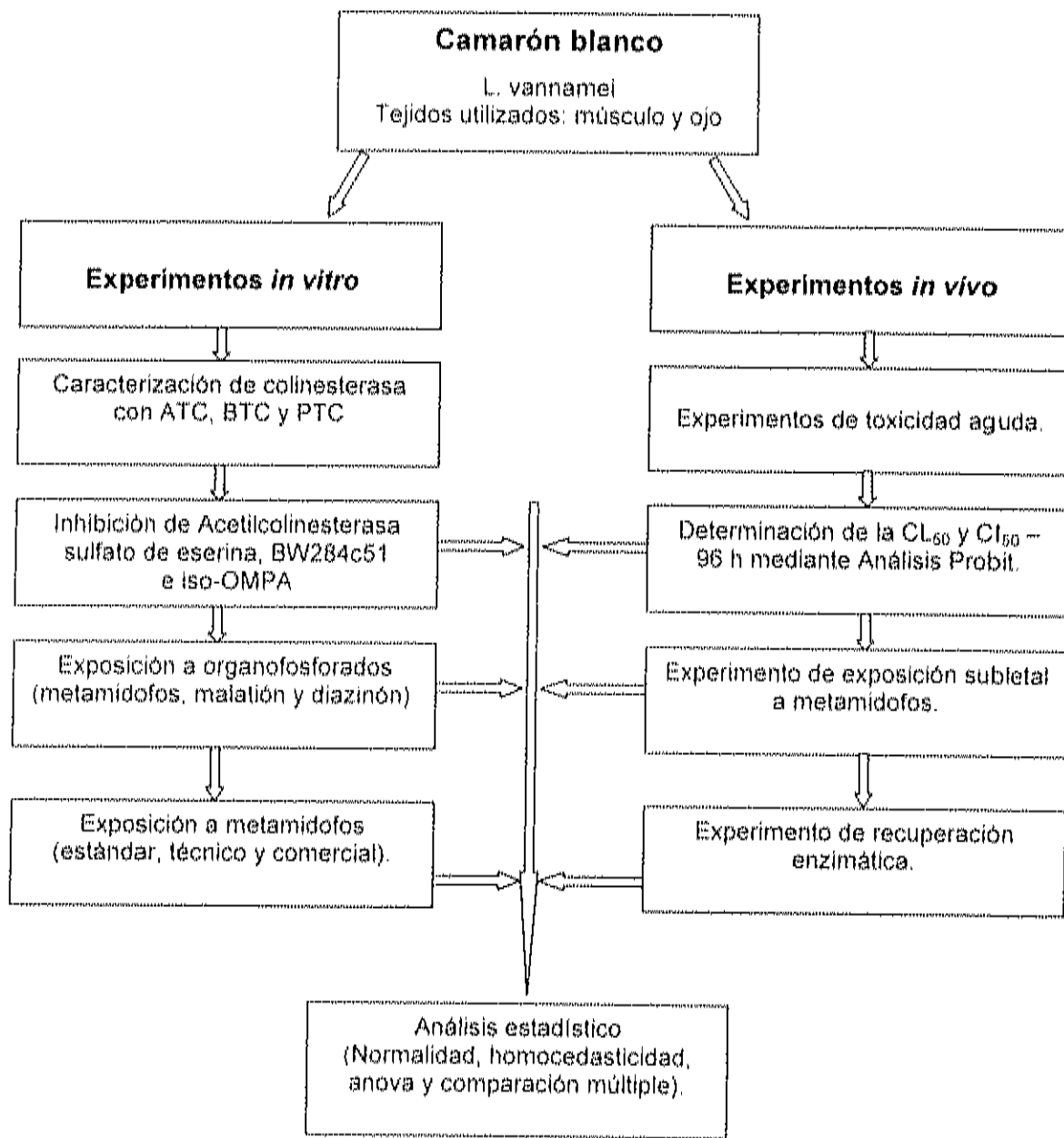
Evaluar el efecto tóxico de insecticidas organofosforados en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mediante la realización de bioensayos de toxicidad y la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) en bioensayos *in vitro* e *in vivo*.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar *in vitro* la colinesterasa presente en músculo y ojo de camarón blanco utilizando diferentes concentraciones de sustratos (ATC, BTC, PTC), e inhibidores específicos (sulfato de eserina, iso – OMPA y BW 284c51).
- Determinar la inhibición de AChE en ojo y músculo de camarón expuesto *in vitro* a diferentes concentraciones de malatión, diazinón y metamidofos grado estándar.
- Determinar la inhibición de AChE en ojo y músculo expuesto *in vitro* a metamidofos (grado técnico, estándar y comercial)
- Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) a 96h y la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) a 96h del metamidofos comercial, sobre juveniles de camarón blanco *L. vannamei*.
- Evaluar la inhibición de AChE ocasionada por el metamidofos sobre juveniles de *L. vannamei* a diferentes concentraciones subletales y a diferentes tiempos de exposición.
- Establecer la recuperación de la actividad de AChE en músculo y ojo de camarón, posterior al tiempo de exposición subletal al metamidofos
- Determinar la actividad de acetilcolinesterasa en organismos acuáticos colectados en el sistema lagunar de Navachiste, Sinaloa.

## 4. MATERIALES Y METODOS

La metodología seguida para el presente estudio se puede resumir básicamente en dos etapas, las cuales están ejemplificadas en el siguiente diagrama



#### 4.1 Material biológico

El organismo prueba utilizado en este estudio fue el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Los organismos fueron donados por el laboratorio de producción de larvas de Maricultura del Pacífico S.A. Los organismos fueron obtenidos normalmente en el estadio postlarval pl 12 (8-10 mm de longitud) y fueron transportados al laboratorio en bolsas de plástico de 25 litros de agua de mar dentro de hieleras.

Una vez en el laboratorio, los organismos se colocaron en tanques de 50 litros, aclimatándose paulatinamente hasta alcanzar la temperatura, salinidad y oxígeno del agua de mar utilizada en el laboratorio (temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidad  $32 \pm 2$  ppm y oxígeno  $5.43 \text{ mg l}^{-1}$ ). Posteriormente se trasladaron a tanques de 600 litros de capacidad.

Los organismos se alimentaron varias veces al día con alimento vivo (*Artemia*, brine shrimp eggs Utha USA) y alimento elaborado (brine shrimp flakes, salt creek Utha USA). Asimismo, se realizaron recambios de agua diarios del 60 – 70% y periódicamente se tomaron algunos parámetros de calidad del agua (temperatura, salinidad y oxígeno). Este procedimiento se continuó por ocho semanas hasta que los organismos alcanzaron 1 gramo de peso y aproximadamente 5 cm de longitud para ser utilizados en los experimentos *in vivo*.

Los organismos utilizados en los experimentos *in vitro*, fueron de mayor tamaño. La longitud promedio fue de  $7.9 \text{ cm} \pm 1.0 \text{ cm}$ . El peso de los organismos fue de aproximadamente  $3.82 \pm 0.98 \text{ g}$ . Los organismos utilizados en estos experimentos fueron mantenidos como anteriormente fue descrito.

## 4.2 Medición de AChE

### 4.2.1 Preparación de reactivos

#### 4.2.1.1 Tampón fosfato

En la preparación del tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, se utilizó una solución 0.1 M de  $K_2HPO_4$  (17.42 g l<sup>-1</sup>) y otra solución 0.1 M de  $KH_2PO_4$  (13.6 g.l<sup>-1</sup>) ambas fueron diluidas en agua ultra pura; se mezclaron pequeñas cantidades de las soluciones hasta obtener un pH de 7.2, para posteriormente almacenar la solución en refrigeración.

#### 4.2.1.2 Preparación de la solución de reacción:

Solución 1. En la preparación de acetiltiocolina como substrato 0.075 M, se pesaron 10.8 mg de este substrato y se disolvieron en 0.5 ml de agua ultra pura.

Solución 2. Para la preparación del DTNB 10mM, se pesaron 9.9 mg de este reactivo además 3.75 mg de hidrógeno carbonato de sodio. Ambos fueron diluidos en 2.5 ml de tampón fosfato pH 7.2

En la preparación de la solución de reacción se utilizaron 30 ml de tampón fosfato, añadiéndose 0.2 ml de la solución (1) y 1 ml de la solución (2).

#### 4.2.1.3 Solución de reacción (Proteína)

La solución de reacción fue hecha utilizando reactivo Bio-Rad y agua ultra pura, en una proporción 1:4 (6 ml de reactivo Bio-Rad y 24 ml de agua ultra pura).

### 4.3 Preparación de las muestras

#### 4.3.1 Homogenización y centrifugación

La actividad de acetilcolinesterasa fue realizada en muestras de músculo y ojos (Figura 3). La muestra de músculo se tomó de la parte dorsal del camarón. Los ojos fueron extirpados juntos con el pedúnculo. Los tejidos fueron suspendidos por separado en una solución tampón de fosfatos 0.1 Molar un pH 7.2, en una relación 1:5 (peso/volumen) y se homogeneizaron durante un tiempo máximo de un minuto a 7000 rpm. en un homogenizador (Poli-trón PT-1300D). Las suspensiones se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso para evitar la desactivación de la enzima.

Las suspensiones resultantes del homogeneizado se centrifugaron a 8500 rpm durante 30 minutos en una centrifuga (BECKMAN GS-15R), a 4°C. Una vez centrifugado se separó el sobrenadante y se almacenó a -20°C durante 24h, hasta su análisis.

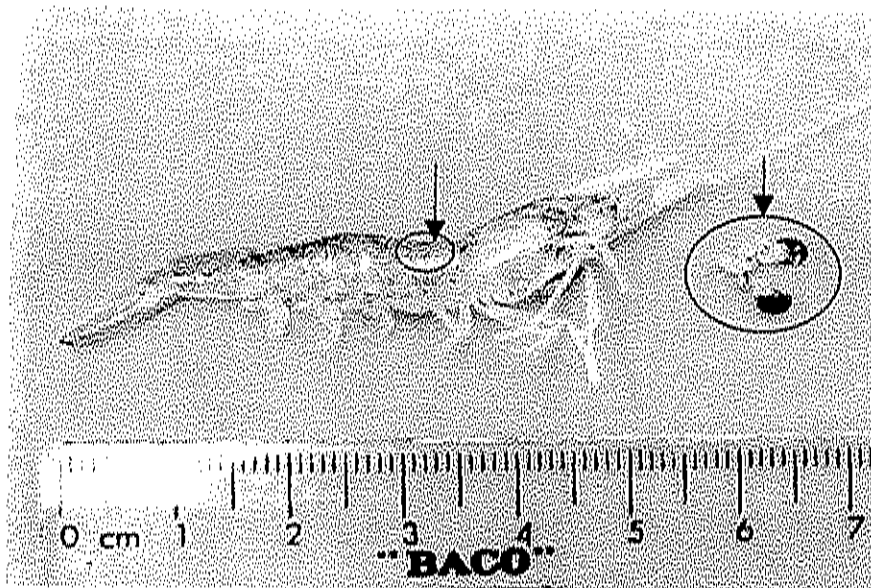


Figura 3. Las flechas indican la porción de músculo y ojos utilizados para la determinación de AChE.

#### 4.3.2 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), adaptado a microplaca (Herbert *et al.*, 1995). Se utilizó reactivo Bio-Rad como solución de reacción en una proporción 1:4 con agua ultra pura.

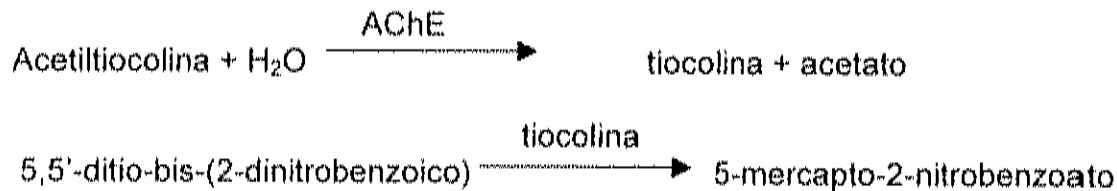
La solución patrón de proteína utilizada fue de  $0.2 \text{ mg ml}^{-1}$  de albúmina suero de bovino. La recta de calibración se realizó a partir de la solución patrón, con las siguientes concentraciones: 0, 0.001, 0.002 y  $0.004 \text{ mg ml}^{-1}$ . Se utilizaron diferentes cantidades de agua ultra pura, y diferentes volúmenes de solución de reacción en las siguientes proporciones:

Sol. de BSA (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	Sol. De reacción Bio-Rad (ml)	Conc mg/ml
0	0.020	0.240	0
0.005	0.015	0.240	0.001
0.010	0.010	0.240	0.002
0.020	0	0.240	0.004

Para determinar la cantidad de proteína se tomaron  $10 \mu\text{l}$  de cada muestra por cuatuplicado y posteriormente se agregaron  $250 \mu\text{l}$  de solución de reacción, se esperó 15 minutos, al término del tiempo señalado se llevaron a cabo las lecturas de absorbancia en el lector de placas (Multiskan Ascent modelo 354 de Labsystems) a  $595 \text{ nm}$ . Posteriormente con la recta ajustada en la curva estándar, se procedió a calcular la cantidad de proteína en cada una de las muestras, expresando la cantidad de proteína en  $\text{mg ml}^{-1}$ .

#### 4.3.3 Análisis de la actividad de AChE

Para medir la actividad de la acetilcolinesterasa se utilizó la metodología descrita por Ellman *et al.*, (1961), adaptada a microplaca (Herbert *et al.*, 1995), la cual se basa en un método colorimétrico con el siguiente principio:



La acetilcolina es hidrolizada por la enzima AChE para formar acetato y tiocolina, esta última reacciona con el 5,5'-ditio-bis-(2-dinitrobenzoico) (DTNB), liberando 5-mercapto-2-nitrobenzoato. Este producto es de color amarillo y puede cuantificarse espectrofotométricamente, ya que se absorbe a 414 nm y presenta un coeficiente de extinción de  $\epsilon = 1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . En las condiciones utilizadas, la reacción entre el DTNB y la tiocolina se produce rápidamente, por lo tanto la velocidad observada es equivalente a la reacción catalizada por la AChE.

Los cálculos fueron hechos basándose en la Ley de Beer- Lambert:

$$C = DO / (\epsilon \cdot d)$$

Donde,

$\epsilon = 1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (coeficiente de extinción molar del ácido 5,5'-ditio-bis-2-dinitrobenzoico a 414 nm).

$d$  = diámetro o espesor de la microcelda (0.9 cm)

$DO$  = densidad óptica

La actividad de AChE por miligramo de proteína esta dada por:

$$R = \frac{m \text{ DO} \cdot \text{FD}_{\text{EA}} \cdot F}{0.0136 \cdot d \cdot t \cdot \text{Cpr} \cdot \text{FD}_{\text{PA}}} \text{ [ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ ]}$$

Donde,

$\text{Cpr}$  = es la concentración de proteína de la muestra ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

$\text{FD}_{\text{PA}}$  = es el factor de dilución utilizada en la proteína (en caso de ser diluida),

$\text{FD}_{\text{EA}}$  = es el factor de dilución utilizada en el ensayo enzimático (en caso de ser diluida).

$F$  = es el volumen total de la microcelda/volumen de la muestra del sobrenadante ( $300/50 = 6$ ).

La placa utilizada para el análisis fue de 96 pozos. Se midieron 50  $\mu$ l del sobrenadante y 250  $\mu$ l de una solución de reacción compuesta de acetiltiocolina 0.075 mM y 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzoico) DTNB 10 mM, preparada como se mencionó anteriormente. Una vez aplicada la solución de reacción se esperó 10 minutos y se realizó la primera lectura, posteriormente se esperó 5 minutos más y se llevó a cabo una segunda lectura. Las lecturas de absorbancia fueron hechas en el lector de placas a 414 nm.

Se calculó la diferencia de DO entre la segunda lectura (tiempo 5) y la primera (tiempo 0), tanto de las muestras como del blanco. Posteriormente, la diferencia del blanco fue restada a la diferencia de las muestras y se divide entre 5 para obtener la densidad óptica por minuto. La actividad de AChE, se expresa en  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.



#### 4.4 Caracterización *in vitro* de Colinesterasa

##### **4.4.1 Actividad de AChE con tres diferentes substratos**

La caracterización de la colinesterasa del camarón (*L. vannamei*) en músculo y ojo fue realizada determinando *in vitro* la actividad de la colinesterasa. Se utilizaron tres substratos diferentes; acetiltiocolina (ATC), butiriltiocolina (BTC) y propioniltiocolina (PTC). Esto fue hecho con la finalidad de conocer el grado de afinidad de la colinesterasa (ChE) con los substratos utilizados, y poder determinar el substrato y concentración del mismo que presenta una mayor actividad con la enzima. Para esto se ensayaron 9 concentraciones de cada substrato, en un intervalo de 0.001 a 500 mM.

Los organismos utilizados en estos experimentos fueron colocados en agua a una temperatura de 4°C para provocarles una muerte rápida y después diseccionarlos inmediatamente.

El organismo se diseccionó separando el músculo de la parte dorsal y los ojos con el pedúnculo, eliminando la cutícula. El músculo de 10 organismos se mezcló y se tomaron 10 muestras de aproximadamente 0.7 g, que se mezclaron con solución tampón de fosfatos pH 7.2 en una proporción 1:5 (p/v). En el caso de los ojos, se homogeneizaron los ojos de cinco organismos, el homogeneizado se preparó en la misma proporción de tampón fosfato que el utilizado en músculo. Todo el procedimiento fue realizado sobre hielo.

Los homogeneizados de los dos tejidos se centrifugaron a 8500 rpm durante 30 min a 4°C en una centrifuga Beckman GS-15R utilizando un rotor F1010. Posteriormente, se separaron los sobrenadantes y se almacenaron en tubos eppendorf a -20°C hasta su análisis.

Para determinar la actividad de la colinesterasa con sustratos específicos, el sobrenadante de músculo se diluyó en una proporción 1:2 con tampón fosfato. El sobrenadante de ojo de camarón se diluyó a 1:9

La preparación del blanco se realizó con 250  $\mu$ l de solución de reacción hecha de la siguiente manera: 30 ml de tampón fosfato + 1ml de DTNB + 0.2 ml de agua ultra pura. Las mezclas de reacción con las diferentes concentraciones de sustratos fueron preparadas sustituyendo el agua ultra pura utilizada en el blanco, por diferentes volúmenes de cada sustrato, ajustando siempre al mismo volumen final con tampón fosfato. Para las mezclas de reacción de cada sustrato se utilizaron diferentes volúmenes para obtener las siguientes concentraciones: 0.001, 0.1, 1.0, 5.0, 25, 50, 125, 250 y 500 mM. Para cada concentración se colocaron 50  $\mu$ l de la muestra y se añadieron 250  $\mu$ l de solución de reacción. Se leyó la absorbancia de las diferentes muestras a 414 nm a los 10 y 15 minutos después de la reacción. Las lecturas en las muestras de músculo y en ojo se hicieron por cuatriplicado para cada concentración, y cada sustrato se analizó por triplicado.

La determinación de la cantidad de proteínas en músculo y ojo, fue realizada utilizando una dilución del homogeneizado de 1:29 con tampón fosfato. Las lecturas fueron hechas por cuatriplicado a 595 nm. Se utilizó el mismo factor de dilución para la determinación de proteínas en todas las determinaciones bioquímicas.

Para la determinación de  $K_m$  (Constante de Michaelis), se utilizó el método de Lineweaver-Burk. Para el caso de músculo en ATC se calcularon los inversos de los valores de las concentraciones de 5 a 125 mM., PTC 25 a 500 mM y BTC de 125 a 500 mM. Para ojo los inversos de los valores fueron en ATC de 25 a 500 mM. PTC 5 a 500 mM y para BTC 125 a 500 mM.

#### 4.4.2 Inhibición de la actividad de AChE utilizando tres diferentes inhibidores

En la caracterización de la colinesterasa, se utilizaron inhibidores con diferente especificidad con la finalidad de saber cual colinesterasa está mayormente presente en la muestra estudiada (músculo y ojo de camarón blanco), asimismo conocer el grado de inhibición sobre la actividad de AChE. Para esto se utilizaron tres inhibidores de marca SIGMA: a) sulfato de eserina que es un carbamato que inhibe potentemente las colinesterasas (Volle, 1971), b) dibromuro 1,5-bis (4-alildimetilamínofenil) - pentan-3-ona (BW284c51) que es un inhibidor reversible selectivo de acetilcolinesterasa (Xu y Bull, 1994) y c) tetraisopropilpirofosforamida (iso-OMPA) que es un organofosforado que inhibe potentemente la butirilcolinesterasa pero no en gran medida la AChE (Barahona *et al.*, 1999).

La proporción de tejido utilizado en la homogenización fue 1:5 (p/v) por lo que a cada organismo (de un total de 10) se le extirpó 0.5 g y se añadieron 2.5 ml de tampón fosfato. La centrifugación del homogenizado fue realizado de acuerdo al apartado 4.3.1. La dilución utilizada para el análisis bioquímico en músculo fue de 1:2 (500  $\mu$ l del sobrenadante por 1000  $\mu$ l de tampón fosfato) y en ojo fue de 1:9 (100  $\mu$ l del sobrenadante por 900  $\mu$ l de tampón fosfato).

Para los tres inhibidores se prepararon cinco concentraciones diluidas en etanol absoluto. Para eserina y BW284c51 las concentraciones utilizadas estuvieron en un intervalo de 0.00625 a 0.1 mM, mientras que para iso-OMPA fueron de 0.5 a 8 mM. Para ensayar las concentraciones de cada uno de los inhibidores se tomaron 0.008 ml de cada concentración milimolar y se adicionaron a 0.492 ml del sobrenadante homogenizado, para posteriormente incubarse en un baño María (modelo VWR – 1227) a 25°C por 30 minutos. Finalizado el tiempo establecido se determinó la actividad de la AChE, tanto en músculo como en ojo de camarón. Para esto se utilizaron 50  $\mu$ l de la muestra incubada con 250  $\mu$ l de solución de reacción, registrándose la absorbancia a los 10 y 15 minutos a 414 nm de longitud de onda. Se

utilizaron dos controles, uno con el sobrenadante y agua ultrapura y el otro con el sobrenadante y etanol.

#### **4.4.3 Inhibición *in vitro* de la actividad de AChE con tres diferentes compuestos organofosforados (metamidofos, malatión y diazinón).**

Se determinó la inhibición de la actividad *in vitro* de AChE en músculo y ojo de organismos expuestos a diferentes concentraciones de los plaguicidas organofosforados: malatión, metamidofos y diazinón. Para esto se preparó una muestra combinada de 10 organismos utilizando el músculo y los ojos por separado. Las muestras fueron homogenizadas en solución tampom fosfato en una proporción 1:5 (p/v) y posteriormente se centrifugaron a 8500 revoluciones por minuto durante 30 minutos a 4°C. Para el análisis enzimático el sobrenadante fue diluido en una proporción 1:2 para músculo y 1:9 en ojo.

Se utilizaron tres compuestos organofosforados grado estándar. De cada uno se prepararon cinco concentraciones diferentes diluidas con acetato de etilo (HPLC). En el caso del metamidofos 77 % de pureza, las concentraciones utilizadas fueron; 0.000282, 0.00056, 0.00113, 0.0022 y 0.0045 mg ml<sup>-1</sup>, para el malatión (91 %); 0.00024, 0.00048, 0.00096, 0.00192 y 0.00384 mg ml<sup>-1</sup> y finalmente para el diazinón (92% ), las concentraciones utilizadas fueron; 0.00359, 0.000718, 0.00143, 0.00287 y 0.0057 mg ml<sup>-1</sup>. Se incubaron 492 µl de muestra con 8 µl del plaguicida a 25°C durante 30 minutos, para posteriormente colocar 50 µl de cada una de las concentraciones en la placa de lectura con 250 µl de solución de reacción. Los valores de absorbancia (414 nm) fueron registrados a los 10 y 15 minutos. Las lecturas fueron hechas por muestra y por cada concentración de plaguicida, así como también la de los blancos utilizados (con y sin solvente). Se realizaron las lecturas por cuatuplicado y se realizó un triplicado por cada compuesto organofosforado ensayado.

En la determinación de proteína se utilizó una dilución 1:29 del sobrenadante con tampón fosfato. Las lecturas fueron realizadas por cuatuplicado para cada muestra a 595 nm. La cuantificación de acetilcolinesterasa se efectuó de la misma manera como se explica en el apartado 4.3.3.

#### **4.4.4 Inhibición *in vitro* de la actividad de AChE con tres presentaciones de metamidofos (grado estándar, técnico y comercial).**

Una vez obtenido el material biológico tanto de músculo como de ojo, se diluyeron las muestras con tampón; 1:2 para músculo y 1:9 para ojo. La preparación de las muestras se hizo de la misma manera que en el apartado 4.3.

El metamidofos grado estándar utilizado fue de 77% de pureza de acuerdo a SUPELCO, (U.S.A. Kit-520 dx). El grado técnico presentó un 73.3% de I.A., según la empresa BAYER (México), mientras que grado comercial presentó un 48.3% de I.A., según la empresa formuladora BAYER (México).

Se prepararon cinco concentraciones para cada presentación de metamidofos: 0.000282, 0.00056, 0.00113, 0.0022 y 0.0045 mg ml<sup>-1</sup>. Las soluciones fueron diluidas en acetato de etilo. Para el ensayo se utilizaron 0.492 ml del sobrenadante y se agregaron 0.008 ml de cada una de las diferentes concentraciones. Estas fueron incubadas a 25°C durante 30 minutos. Cada concentración fue preparada por cuatuplicado y en cada una de las presentaciones de metamidofos el análisis enzimático fue realizado por triplicado. Se utilizaron dos controles: 0.492 ml de sobrenadante más 0.008 ml de agua ultra pura y otro con 0.492 ml del sobrenadante más 0.008 ml de acetato de etilo.

Para la determinación de proteínas la dilución del sobrenadante utilizada fue 1:29 con tampón fosfato. Se utilizaron 10 µl de cada una de las muestras por 250 µl de

solución de reacción, se esperó 15 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se calculó la actividad de AChE del mismo modo que el apartado 4.3.3.

## 4.5 Experimentos *in vivo*

### **4.5.1 Determinación de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>)**

Para la determinación de la CL<sub>50</sub>-96h del metamidofos presentación comercial, se realizaron bioensayos preliminares con juveniles de *L. vannamei* con la finalidad de conocer la mínima concentración que produzca un 100% de mortalidad y la máxima concentración que no ocasione mortalidad. Esto permitió estimar el intervalo de toxicidad a utilizar en los experimentos letales definitivos. En los experimentos preliminares fueron utilizados seis organismos en seis litros de agua de mar expuestos a metamidofos. Se ensayaron tres concentraciones, las cuales fueron: 0.125, 1.25 y 12.5 mg l<sup>-1</sup>. Este experimento de intervalo de toxicidad tuvo una duración de 96 horas y no se realizaron réplicas.

Con los resultados obtenidos en el bioensayo anteriormente mencionado, se distribuyeron logarímicamente seis concentraciones de metamidofos para el bioensayo definitivo. Previamente al bioensayo definitivo, los organismos permanecieron en un periodo de cuatro días en aclimatación, con alimentación y recambio de agua diariamente, sólo que un día antes de la aplicación del plaguicida se dejó de alimentar para evitar interferencia por la presencia del alimento.

Los bioensayos definitivos fueron estáticos, con recambio de agua total (seis litros de agua de mar) y del plaguicida cada 24 horas. Se utilizó camarón blanco en

etapa juvenil. El fotoperíodo fue controlado 12 h luz/ 12 h oscuridad, la salinidad de  $32 \pm 2$  ‰, temperatura de  $25 \pm 1$  °C, cantidad de oxígeno de  $5.43 \text{ mg l}^{-1}$  y pH 8.3.

Se experimentaron seis concentraciones de metamidofos: 0.296, 0.526, 0.937, 1.249, 1.66 y  $2.963 \text{ mg l}^{-1}$  y un control. Para cada concentración utilizada se realizaron tres réplicas con 10 juveniles por concentración. La duración del experimento fue de 96 horas y las observaciones de mortalidad fueron realizadas a los tiempos de 0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Al término del tiempo experimental la  $CL_{50}$  se obtuvo mediante el método de unidades probabilísticas PROBIT (Finney, 1971). Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo a consideraciones del manual de bioensayos de toxicidad de la FAO (1981).

#### 4.5.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media ( $CI_{50}$ )

Como continuación del experimento anterior, se procedió a cuantificar la actividad de AChE en los organismos que sobrevivieron a la exposición al metamidofos. Se analizaron 10 organismos por concentración, mientras que en la mayor concentración sólo fueron analizados 3 organismos.

El análisis de AChE en músculo, fue realizado por individuo para cada concentración. Para el análisis de ojo, se utilizó una muestra combinada de ojos de 10 organismos por concentración. Para la máxima concentración de metamidofos la muestra combinada de ojos fue de tres organismos. La homogenización y centrifugación de las muestras (músculo y ojo) fueron realizadas como en el apartado 4.3.1.

La cuantificación de la actividad de AChE se realizó en músculo y ojo de camarón, utilizando en músculo una dilución 1:2 con tampón fosfato y para ojo fue de 1:9 con tampón fosfato. Para la determinación de proteína de cada una de las muestras la dilución fue de 1:29 con tampón fosfato.

Las lecturas de absorbancia tanto para músculo como en ojo fueron hechas por cuatuplicado a 414 nm. La cuantificación de la actividad de AChE fue determinada según el apartado 4.3.3. La determinación del porcentaje de inhibición se realizó de acuerdo a Escartín (1999) con la siguiente relación:

$$\% \text{ de inhibición} = [ 1 - (\text{actividad}_{\text{muestra}} / \text{actividad promedio}_{\text{control}}) ] * 100$$

A partir del porcentaje de inhibición de cada una de las muestras en cada concentración, la  $CL_{50} - 96h$ , fue obtenida mediante el método de unidades probabilísticas PROBIT (Finney, 1971).

#### **4.5.3 Inhibición de la actividad de AChE a concentraciones subletales de metamidofos**

En este experimento se ensayaron tres concentraciones subletales de metamidofos. Estas concentraciones fueron seleccionadas a partir de un tercio de la  $CL_{50}$  determinada en el experimento anterior. Las concentraciones probadas fueron; 0.125, 0.296 y 0.526  $mg l^{-1}$  y su respectivo control. Posterior a la aclimatación, a los organismos expuestos se les realizó recambio de agua y del plaguicida cada 24 horas. No se proporcionó alimento durante todo el tiempo experimental (96 horas).

Una vez aplicadas las concentraciones del metamidofos grado comercial, se analizó la actividad de AChE en seis organismos de cada concentración. Este procedimiento se realizó a los tiempos; 6, 24, 48 y 96 horas de la exposición al metamidofos.



A cada uno de los organismos se les extirpó aproximadamente 0.3 gramos de músculo y 0.2 gramos de ojo por separado, los cuales se suspendieron en solución tampón fosfato a una proporción 1:5 (p/v). Se homogenizaron y centrifugaron según el procedimiento descrito en el apartado 4.3.1. Para el músculo se hizo una dilución de 1:2 con tampón fosfato, para ojo de 1:9 con tampón fosfato. Las lecturas de absorbancia de AChE y proteína se realizaron según el procedimiento descrito en 4.3.2 y 4.3.3. Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los valores de actividad de AChE para cada una de las muestras y para cada tiempo de exposición.

#### **4.5.4 Estimación de la recuperación de la actividad de AChE después de exposición a metamidofos.**

Este experimento consistió en evaluar y conocer una posible recuperación de la actividad de AChE posterior a exposiciones subletales de metamidofos. Para realizar esto, se procedió a exponer juveniles de camarón blanco a tres concentraciones subletales de metamidofos utilizadas en el experimento anterior; 0.125, 0.296 y 0.526 mg l<sup>-1</sup>, bajo las mismas condiciones experimentales del experimento subletal. Al terminar el tiempo de exposición de 96 h, se procedió a efectuar recambios de agua limpia diariamente durante 10 días. Seis organismos se procesaron para determinar la actividad de AChE, a los tiempos de 6, 24, 48, 96, y 240 h.

El análisis de músculo fue realizado individualmente, mientras que para los ojos se obtuvo una muestra combinada de seis organismos por cada concentración y por cada tiempo experimental. Las lecturas de absorbancia de AChE y proteína se realizaron según el procedimiento descrito en 4.3.2 y 4.3.3.

#### 4.6 Muestreos de campo

Se realizaron dos muestreos, uno en diciembre de 1999 y otro en abril del 2000. Se colectaron organismos acuáticos con la ayuda de una red de arrastre en diferentes sitios dentro de la bahía de Navachiste, Sinaloa. Esto con la finalidad de determinar la actividad de acetilcolinesterasa presente en músculo de camarones y peces (ver anexo).

#### 4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico efectuado a los resultados obtenidos en los bioensayos *in vitro* e *in vivo*, consistieron primeramente de la realización de las pruebas paramétricas de normalidad e igualdad de varianza. Estas pruebas determinan si los grupos de muestra son tomados de poblaciones con distribución normal y presentan homogeneidad en sus desviaciones estándar. Las prueba de normalidad fue realizada de acuerdo a Kolmogorov – Smirnov (con la corrección de Lilliefors) y la prueba de igualdad de varianza fue realizada por la prueba (mediana Levene test).

Los datos que no pasaron las pruebas anteriormente mencionadas, fueron analizados por un método no paramétrico. Esta prueba se basa sobre los intervalos de las observaciones, sin tomar en cuenta la distribución de la población de la cual se tomó la muestra. Para esta prueba no Paramétrica se utilizó una ANOVA por rangos (Kruskal – Wallis) a una  $P < 0.05$ . Esta prueba permite determinar si dos o más grupos experimentales diferentes, son afectados por un factor o variable. Posteriormente se realizó una Comparación Múltiple de Promedios, esto fue realizado con la finalidad de determinar si hay diferencias entre grupos. Para aislar esas diferencias se utilizó la prueba de Dunnett's, ésta consiste en comparar todos los grupos respecto a un grupo control, el análisis se llevó a cabo a una  $P < 0.05$ . Para dichos análisis se utilizó el programa de computadora Sigmastat versión 2.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Experimentos *in vitro*

#### 5.1.1 Actividad de AChE con tres diferentes sustratos.

Se utilizaron 10 organismos de  $6.5 \pm 0.71$  cm de longitud promedio y  $2.96 \pm 0.51$  gramos de peso promedio. La actividad de acetilcolinesterasa en tejido muscular de camarón blanco en función del incremento de la cantidad de sustrato se muestra en la Figura 4. La actividad máxima de las colinesterasa con los tres sustratos utilizados se presentó a la mayor concentración (500 mM). La velocidad de hidrólisis del sustrato en músculo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) fue más alta con el sustrato acetiltiocolina (ATC), la cual fue igual a  $4.826 \pm 0.094$ , ligeramente menor con propioniltiocolina (PTC)  $4.747 \pm 0.076$  y considerablemente menor con butiriltiocolina (BTC)  $1.439 \pm 0.066$  nmol \* min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup> de proteína. No se presentó inhibición por exceso de sustrato hasta la concentración de 500 mM.

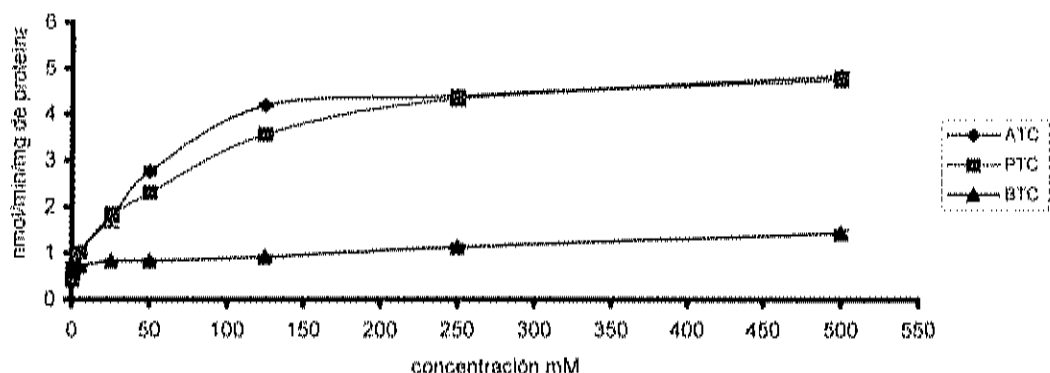


Figura 4. Actividad de colinesterasa presente en músculo. Los valores son el promedio con sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad se expresa en nmol \* min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup> de proteína. ATC (acetiltiocolina), PTC (propioniltiocolina) y BTC (butiriltiocolina).

En ojo, la mayor actividad se presentó en el sustrato de ATC ( $35.368 \pm 1.58$ ) y la mínima se observó en BTC ( $1.377 \pm 0.016 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína). Los resultados y la tendencia de la actividad de colinesterasa para cada sustrato a diferentes concentraciones se muestran en la Figura 5. Aquí se observa que el sustrato de acetililiocolina fue en el que presentó la mayor actividad.

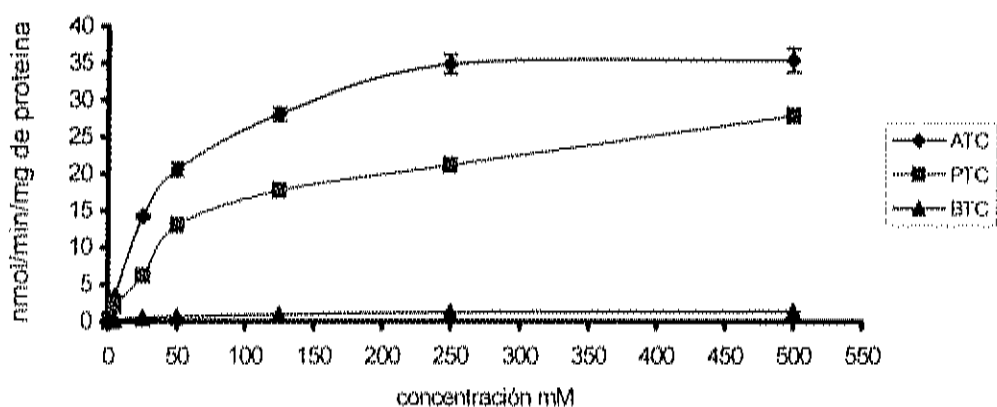


Figura 5. Actividad de colinesterasa presente en ojo, Los valores son el promedio con sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad se expresa en  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. ATC (acetililiocolina), PTC (propionililiocolina) y BTC (butirililiocolina).

Las  $K_m$  determinadas en los sustratos utilizados se muestran en la Tabla 4. Los valores corresponden a las concentraciones milimolares que se necesitan para obtener la mitad de la velocidad máxima de reacción. Estas concentraciones fueron menores en el sustrato de ATC, que en PTC y BTC.

Tabla 4. Valores de Km (ATC, PTC y BTC), obtenidas en las reacciones enzimáticas, utilizando músculo y ojos de camarón blanco (*L. vannamei*). Se utilizó el método de Lineweaver-Burk.

Tejido	ATC		PTC		BTC	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
Músculo	14.50	3.874	73.33	44.61	109.0	1.694
Ojo	43.910	38.910	50.28	23.47	96.28	1.667

#### 5.1.2 Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de la colinesterasa en camarón (*Litopenaeus vannamei*).

Los organismos utilizados en este ensayo presentaron una longitud promedio de  $8.6 \pm 0.72$  cm y un peso de  $3.3 \pm 0.52$  gramos. En los ensayos *in vitro* el sulfato de eserina inhibió considerablemente la actividad enzimática tanto en músculo como en ojos (Figura 6 y 7). La actividad enzimática en ojos se presentó consistentemente más alta que en músculo.

En la máxima concentración (0.1 mM), la actividad de la acetilcolinesterasa en músculo fue de  $1.584 \pm 0.254$ . En el caso del ojo, presentó una actividad de  $3.808 \pm 0.843$   $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Las tendencias de inhibición fueron observadas en ambos tejidos analizados. La inhibición ocasionada por las diferentes concentraciones del sulfato de eserina fue significativamente diferente del tratamiento utilizado con etanol, el cual fue considerado como tratamiento control. El análisis estadístico utilizado fue el de comparación múltiple de Dunnett's ( $P < 0.05$ ).

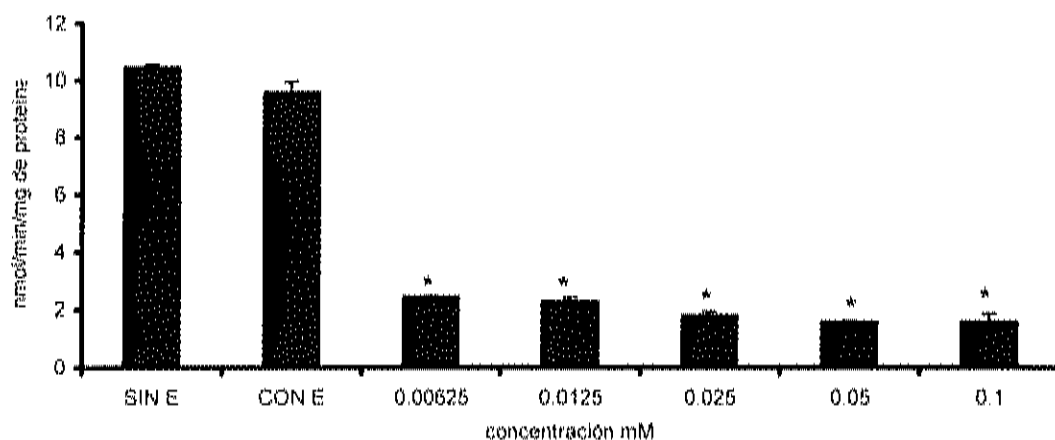


Figura 6. Efecto del sulfato de eserina sobre la actividad de acetilcolinesterasa en músculo de *L. vannamei*. Los valores representan la media de un cuatuplicado por muestra y un triplicado por inhibidor con sus respectivas barras de error estándar (ES). Se encontraron diferencias significativas\* respecto al control (CON E) mediante el análisis de comparación múltiple de Dunnett's a una ( $P < 0.05$ ).

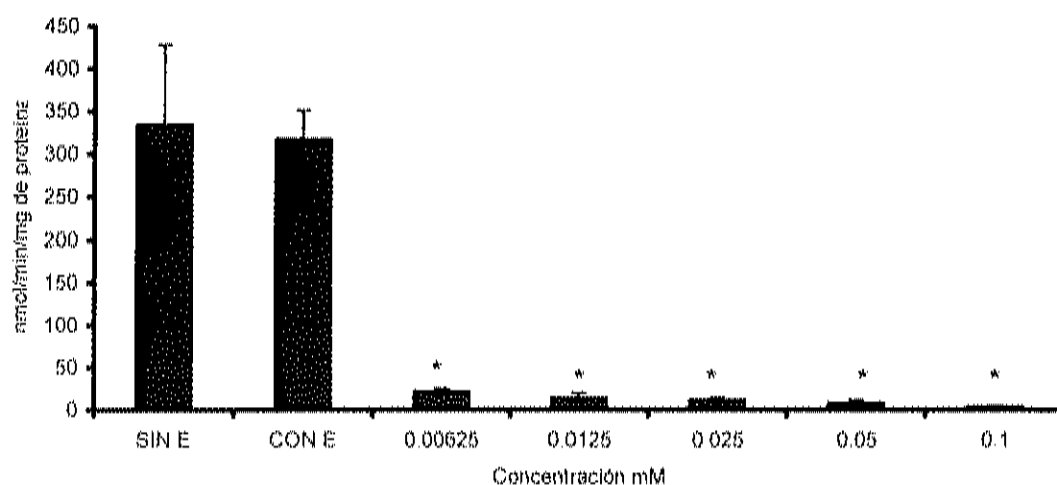


Figura 7. Efecto del sulfato de eserina sobre la actividad de acetilcolinesterasa en ojos de *L. vannamei*. Los valores representan la media de un cuatuplicado por muestra y un triplicado por inhibidor con sus respectivas barras de error estándar (ES). Se encontraron diferencias significativas\* respecto al control (CON E) mediante el análisis de comparación múltiple de Dunnett's a una ( $P < 0.05$ ).

La inhibición por BW284c51 fue significativamente diferente en todos los tratamientos en músculo y ojo respecto a CONE, en el intervalo de concentraciones de 0.00625 – 0.1 mM. La inhibición fue generalmente mayor en ojo que en músculo.

Con el inhibidor BW284c51 la actividad de AChE presente en músculo a la máxima concentración utilizada fue  $2.230 \pm 0.073$  y en ojo de  $5.18 \pm 0.294$   $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína (Figura 8 y 9). La actividad de AChE presente en músculo en presencia de este inhibidor tuvo una tendencia similar en las cinco concentraciones ensayadas, es decir, hubo una inhibición significativa en todas las concentraciones milimolares respecto al control (CONE). En el caso de los valores obtenidos en ojo, se observó una considerable inhibición dependiente de la concentración en mayor magnitud que en músculo, es decir, la inhibición fue mayor, conforme se incrementó la concentración del inhibidor (Figura 9).

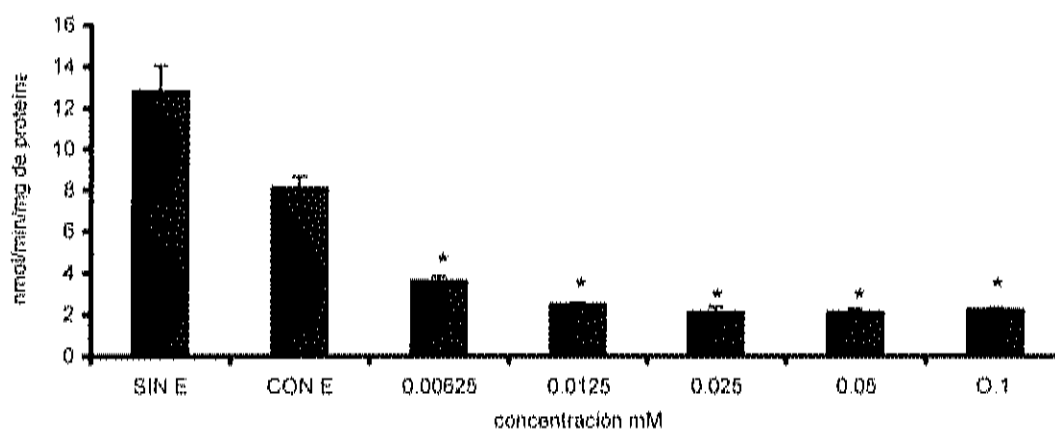


Figura 8 Efecto del BW284c51 sobre la actividad de AChE en músculo. El análisis de comparación múltiple de Dunnett's encontró diferencias significativas \* respecto a CONE a una  $P < 0.05$

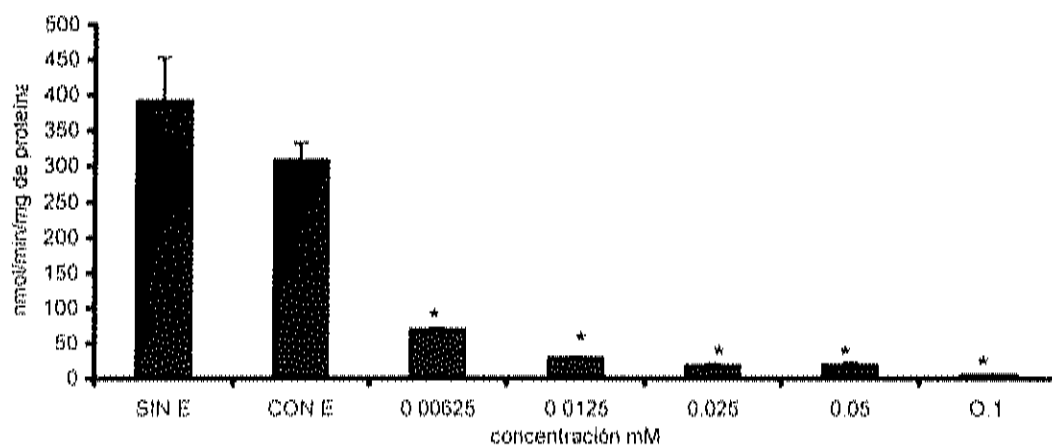


Figura 9. Efecto del BW284c51 sobre la actividad de AChE en ojo de camarón. El análisis de comparación múltiple de Dunnett's encontró diferencias significativas \* respecto a CONE a una  $P < 0.05$

El inhibidor iso-OMPA, tuvo un efecto menor en músculo que en ojos. La actividad de AChE presente en músculo, no fue inhibida significativamente respecto a CONE (Figura 10). La actividad de la colinesterasa presente en músculo en la máxima concentración fue  $10.23 \pm 0.25 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. El análisis de comparación múltiple de promedios (Dunnett's), no encontró diferencias significativas en músculo ( $P < 0.05$ ) en ninguno de los tratamientos con este inhibidor respecto a CONE. En ojo la actividad de colinesterasa en la máxima concentración (8 mM) fue de  $572.02 \pm 1.36 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína (Figura 11). En el caso del ojo, si hubo diferencias significativas mediante la prueba de Dunnett's en tres concentraciones,



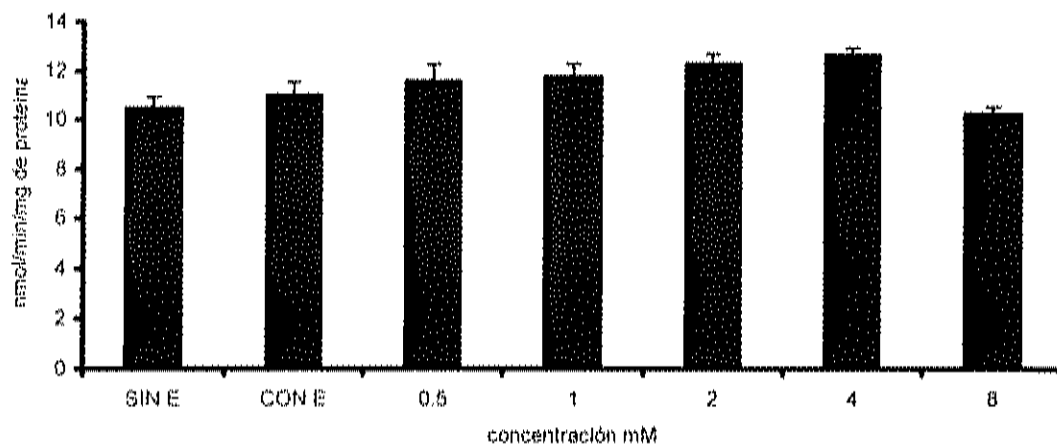


Figura 10. Efecto del iso-OMPA sobre la actividad de AChE en músculo. Los valores representan la media de un cuádruplicado por muestra, y las barras representan el error estándar. No se encontraron diferencias significativas mediante Dunnett's respecto a CON E ( $P < 0.05$ ).

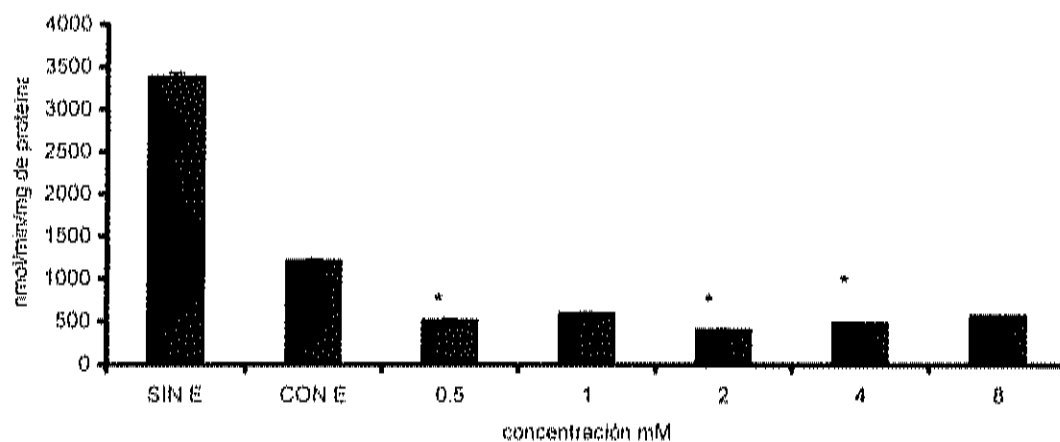


Figura 11. Efecto del iso-OMPA sobre la actividad de AChE en ojo de camarón. Los valores representan la media de un cuádruplicado por muestra y las barras representan el error estándar. El análisis Dunnett's encontró diferencias significativas\* respecto a CON E ( $P < 0.05$ ).

### 5.1.2.1 Determinación del porcentaje de inhibición.

A partir de los datos de actividad de la AChE con cada uno de los inhibidores y en cada tejido, se procedió a calcular los porcentajes de inhibición para cada uno de los inhibidores utilizados. Los porcentajes de inhibición fueron calculados en función al control (CONE), considerando la actividad presente en dicho control como el 100%. En músculo, el porcentaje máximo de inhibición con iso-OMPA fue del 3%, el cual fue menor comparado con el porcentaje obtenido en ojo (66%). Las concentraciones de iso-OMPA fueron mayores (aproximadamente 80 veces, respecto a las utilizadas con los otros dos inhibidores). A pesar de esto, el iso-OMPA representó un porcentaje de inhibición menor en ambos tejidos, comparado con los altos porcentajes de inhibición de sulfato de eserina y BW284c51 en ojo. Por otro lado, los porcentajes de inhibición presentados en músculo fueron menores del 90%. La tendencia en la inhibición de AChE ocasionado por los tres inhibidores en ojo fue semejante a la presentada en músculo (Figura 12 y 13). La tendencia en magnitud de efecto inhibitorio fue en el orden de sulfato de eserina > BW284c51 > iso-OMPA.

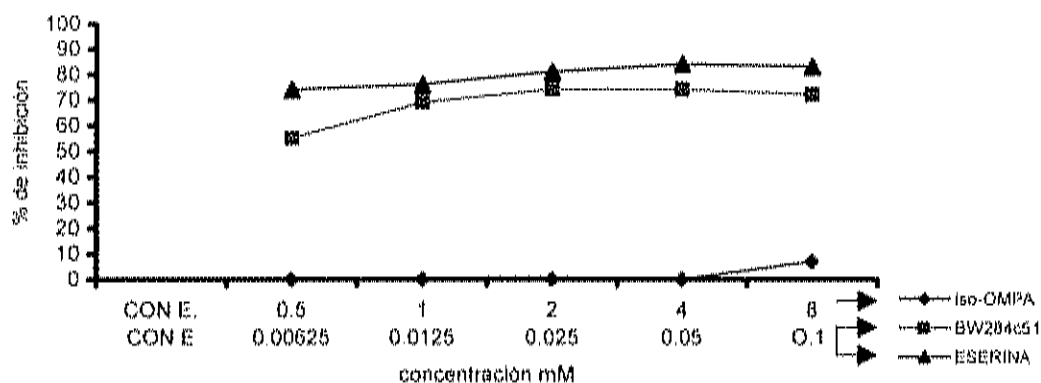


Figura 12. Porcentaje de inhibición *in vitro* de AChE en músculo expuesto a tres inhibidores. El efecto de inhibición en orden es eserina > BW284c51 > iso-ompa.

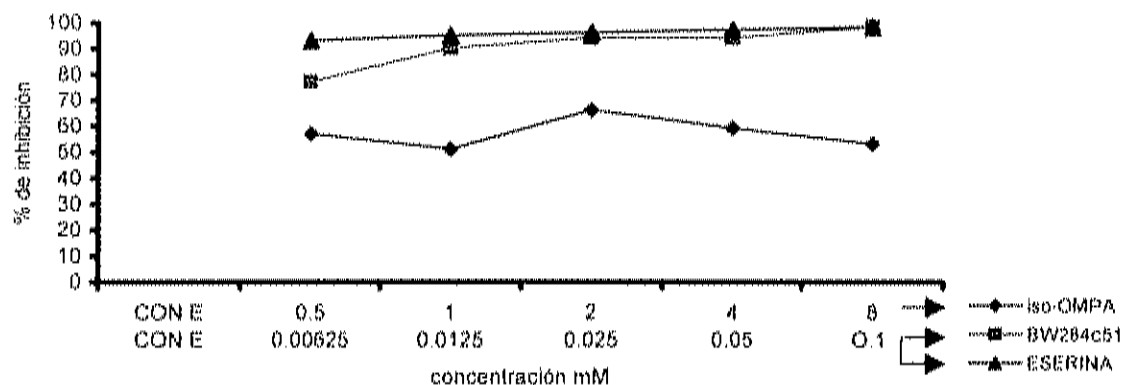


Figura 13. Porcentaje de inhibición *in vitro* de AChE en ojo expuesto a tres inhibidores. El efecto de inhibición es en orden de eserina = BW284c51 > iso-OMPA.

### 5.1.3 Inhibición de la actividad de AChE a diferentes compuestos organofosforados (metamidofos, malatión y diazinón).

Los organismos utilizados en este experimento presentaron una longitud promedio de  $8.8 \pm 0.85$  cm y un peso promedio de  $5.2 \pm 0.93$  gramos. Se determinó la actividad *in vitro* de AChE, utilizando tejido muscular y ojo expuestos a tres plaguicidas organofosforados grado estándar. Los porcentajes de inhibición fueron determinados a partir de la actividad de AChE total presente en el control con acetato de etilo. A pesar de que las utilizadas con malatión fueron menores que las utilizadas en metamidofos y diazinón, el malatión fue el que presentó un mayor efecto inhibitorio en la actividad de AChE en ojo. Por otro lado, el metamidofos fue el que presentó una mayor inhibición en músculo en comparación al malatión y diazinón.

La mayor concentración de malatión ( $0.003 \text{ mg ml}^{-1}$ ) presentó una inhibición de AChE en músculo del 82%, mientras que el ojo registró una inhibición del 92%. La máxima concentración del metamidofos, ocasionó una inhibición de AChE del 91% y 61% en músculo y ojo respectivamente. El estándar organofosforado que presentó la menor inhibición en la máxima concentración ( $0.0057 \text{ mg ml}^{-1}$ ), fue el diazinón con un 23% en músculo y 43% en ojo.

Los datos de inhibición en músculo señalan que el metamidofos es el plaguicida que produce mayor inhibición de acetilcolinesterasa, seguido por el malatión y finalmente el diazinón. La tendencia de inhibición en ojo fue en el orden de malatión>metamidofos>diazinón. Con los tres plaguicidas se ve claramente que el porcentaje de inhibición aumenta cuando se incrementa la concentración, siendo menos evidente con el diazinón. En ambos tejidos se observó que el diazinón fue el plaguicida que produjo la menor inhibición. Estas tendencias se observan en las figuras 14 y 15.

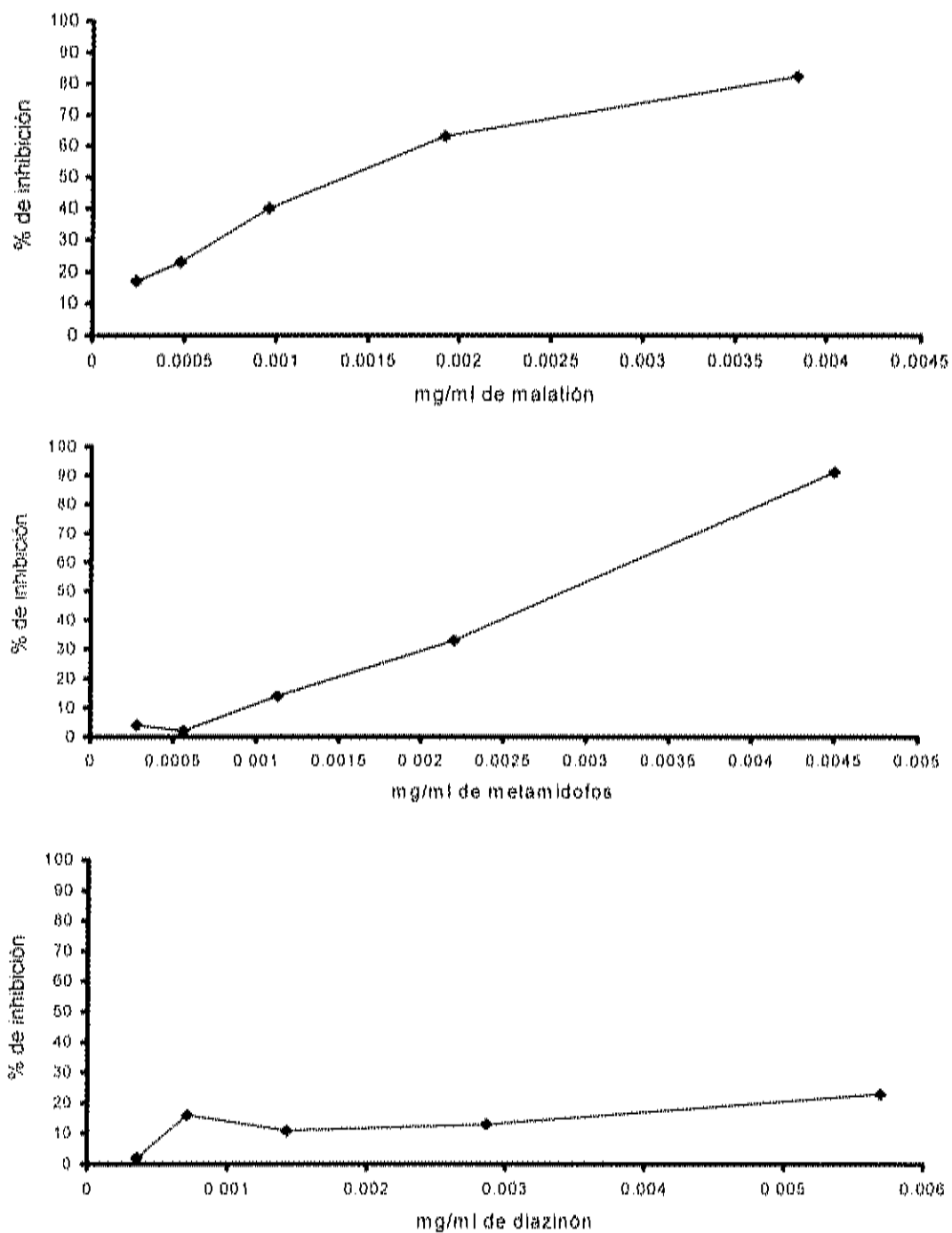


Figura14. Inhibici3n de actividad de acetilcolinesterasa en m3sculo expuesto a tres est3ndares organofosforados.

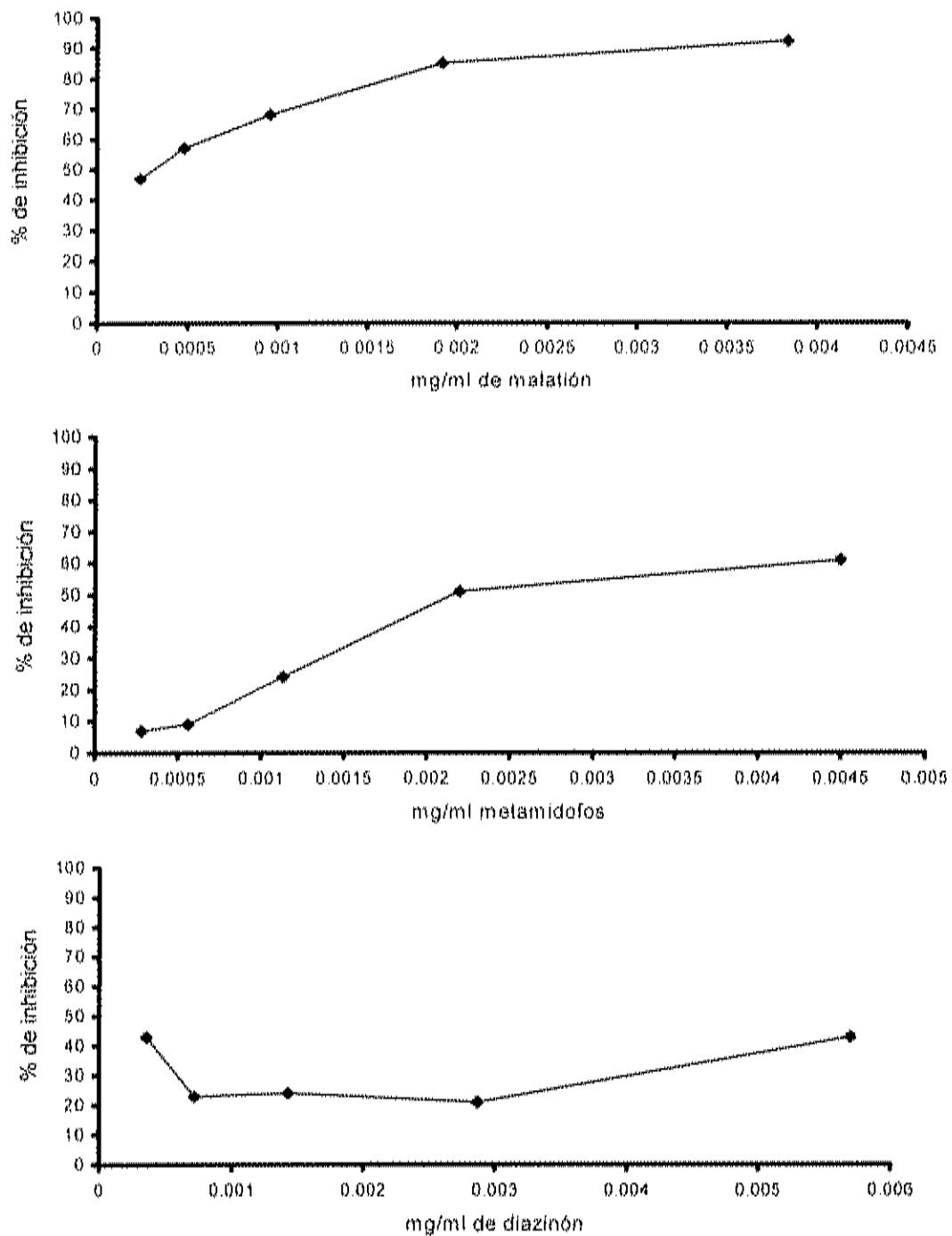


Figura15. Inhibición de actividad de acetilcolinesterasa en ojo expuesto a tres estándares organofosforados.

#### 5.1.4 Inhibición de la actividad de AChE, ocasionada por el efecto del metamidofos en tres presentaciones.

Los organismos utilizados en este experimento presentaron una longitud promedio de  $8.6 \pm 0.72$  cm y un peso de  $4.5 \pm 0.53$  gramos. Se determinó la actividad *in vitro* de AChE en tejido muscular y ojo de camarón blanco expuestos a metamidofos en tres distintas presentaciones: grado estándar, grado técnico y grado comercial.

En la Figura 16, se presentan los porcentajes de inhibición en músculo y ojo de camarón. La presentación comercial de metamidofos fue la que presentó el mayor porcentaje de inhibición en músculo y ojo de camarón. En el caso del músculo, el porcentaje de inhibición a la máxima concentración ( $4.5 \times 10^{-3}$  mg ml<sup>-1</sup>) fue del 66 %, mientras que en ojo a la misma concentración produjo una inhibición del 98 %. Por otro lado, la presentación grado estándar presentó solo un 50% de inhibición a la misma concentración (Figura 18). Los valores de inhibición observadas con el producto comercial y el grado técnico fueron mayores que las presentadas con el estándar. En las dos últimas concentraciones de cada una de las presentaciones utilizadas ( $2.2 \times 10^{-3}$  y  $4.5 \times 10^{-3}$  mg ml<sup>-1</sup>), la inhibición en músculo no es tan marcada como en el caso del ojo. La tendencia de efecto en músculo es en el orden de comercial > técnico > estándar.

Los valores de actividad enzimática encontrados en ojo fueron aproximadamente 30% mayores a los encontrados en músculo. El mayor porcentaje de inhibición en la máxima concentración ensayada ( $4.5 \times 10^{-3}$  mg ml<sup>-1</sup>) fue del 96% y correspondió a la presentación comercial y el menor fue el que se presentó en el grado estándar a la misma concentración con un 76 % de inhibición. La inhibición de AChE encontrada en ojo fue consistentemente mayor cuando estuvo expuesto a la presentación comercial en comparación con las otras dos presentaciones. La actividad de AChE determinada en los tejidos expuestos a cada una de las presentaciones de metamidofos se observó que la actividad fue siempre mayor en ojo que músculo. La tendencia en efecto en ojo, es del mismo orden que la presentada en músculo: comercial > técnico > estándar.

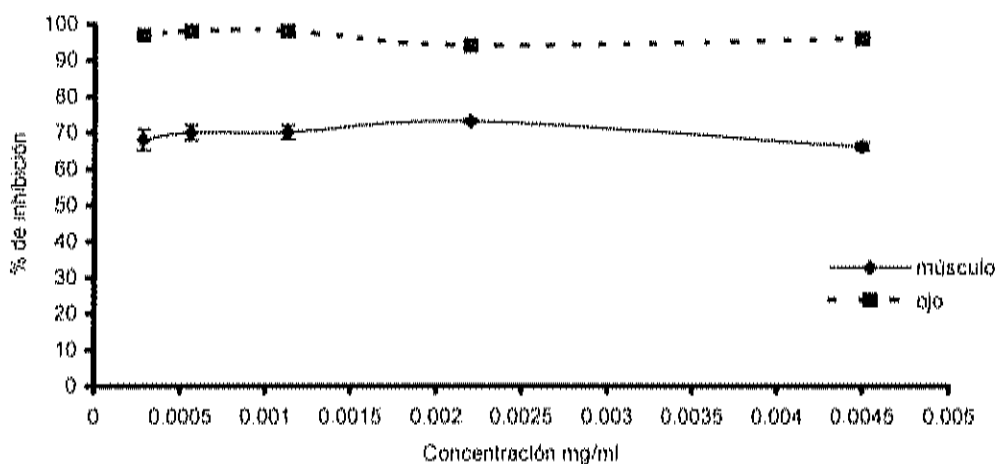


Figura 16. Inhibición *in vitro* de actividad de AChE en ojo y músculo de camarón en presencia de metamidofos grado comercial. Los porcentajes representan el promedio de un cuatriplicado por muestra con su valor de error estándar. Cada presentación de metamidofos se realizó por cuatriplicado.



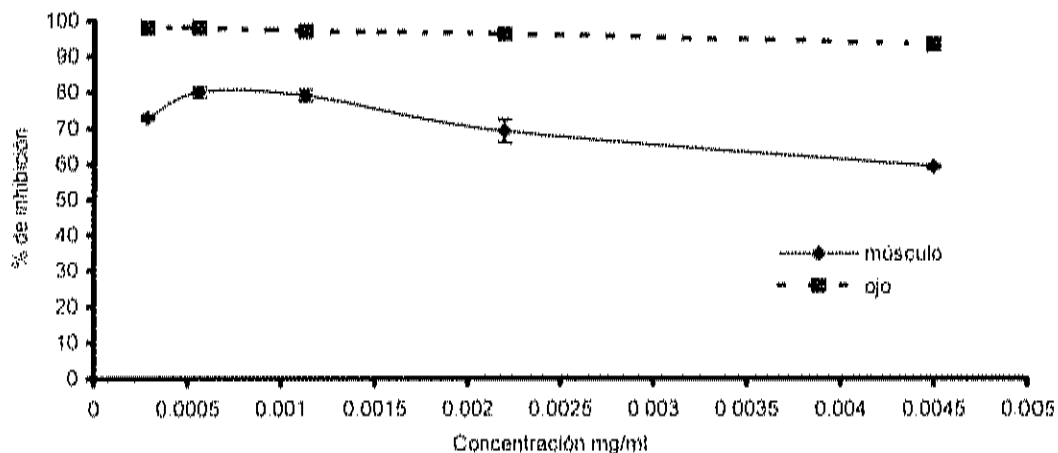


Figura 17. Inhibición *in vitro* de actividad de AChE en ojo y músculo de camarón en presencia de metamidofos grado técnico. Los porcentajes representan el promedio de un cuatuplicado por muestra con su valor de error estándar. Cada presentación de metamidofos se realizó por cuatuplicado.

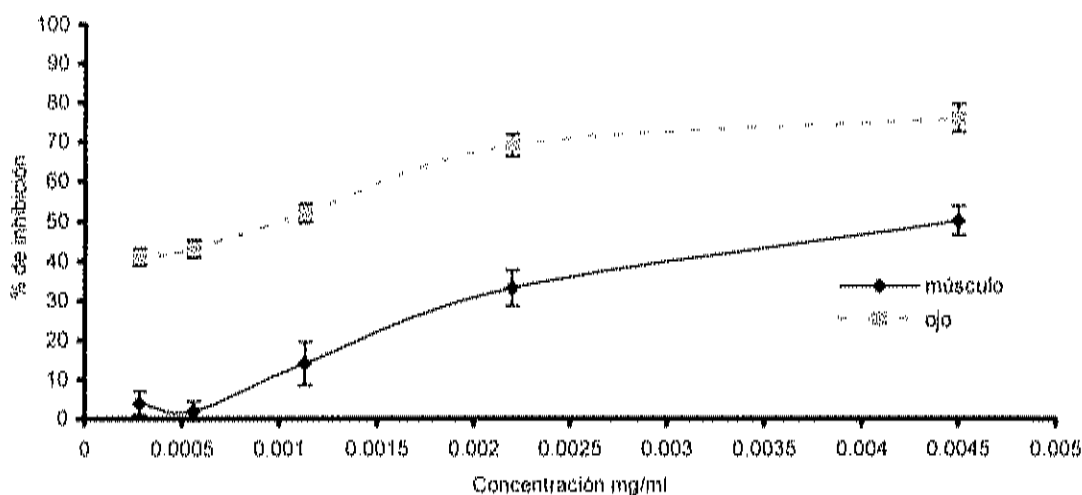


Figura 18. Inhibición *in vitro* de actividad de AChE en ojo y músculo de camarón en presencia de metamidofos grado estándar. Los porcentajes representan el promedio de un cuatuplicado por muestra con su valor de error estándar. Cada presentación de metamidofos se realizó por cuatuplicado.

Las tendencias de inhibición, muestra la poca correlación entre la concentración del metamidofos comercial y el porcentaje de inhibición, sin embargo, su efecto de inhibición en músculo y ojos fueron altos. Una similar tendencia se observó en ambos tejidos cuando estuvieron expuestos al metamidofos grado técnico. Respecto al grado estándar se muestra que en ambos tejidos se observa un buena tendencia dosis-dependiente, pero los porcentajes de inhibición fueron menores comparado con las otras dos presentaciones.

## 5.2 Experimentos *in vivo*

### 5.2.1 Toxicidad letal

#### 5.2.1.1 **Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub> – 96h)**

Se utilizó camarón blanco juvenil de una longitud promedio de  $4.49 \pm 0.11$  cm y un peso de  $0.48 \pm 0.04$  gramos. En el bioensayo para la obtención de la CL<sub>50</sub> – 96h, los organismos expuestos al metamidofos (grado comercial), presentaron una notable hiperactividad sólo en la máxima concentración ensayada ( $2.96 \text{ mg l}^{-1}$ ), este efecto se observó después de 24 horas de exposición. Posteriormente, y conforme aumentaba el tiempo de exposición, se observó movimientos natatorios no coordinados, en todas las concentraciones ensayadas, mientras que en los organismos control no se observó síntomas de estrés. Los organismos expuestos al tóxico presentaron una coloración blanca en todos los segmentos abdominales antes de morir.

Tabla 5. Registro de mortalidad a 96 h de exposición a diferentes concentraciones de metamidofos.

Concentración mg l <sup>-1</sup>	Logaritmo conc.	Organismos expuestos	Mortalidad 96 horas	Porcentaje de mortalidad.	Valores Probit
0	0	30	0	0	--
0.205	-0.5287	30	0	0	--
0.526	-0.2790	30	0	0	--
0.937	-0.0282	30	11	36.6	4.67
1.24	0.0934	30	6	20	4.16
1.65	0.2174	30	12	40	4.75
2.96	0.4712	30	26	86.6	6.13

La CL<sub>50</sub> – 72 y 96 horas fue obtenida mediante análisis Probit por el método de Litchiefeld y Wilcoxon (basado en el desarrollado por R. Cinto y modificado para computadora por E. M. Rodríguez, versión 1994). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración letal media del metamidofos en camarón blanco. El análisis de regresión presentó una correlación dosis-respuesta de 0.931.

Tiempo de exposición	72 horas	96 horas
CL <sub>50</sub>	2.68 mg l <sup>-1</sup>	1.67 mg l <sup>-1</sup>
Intervalos de confianza P(<0.05)	(2.27 – 3.5)	(1.44 – 1.99)

### 5.2.1.2 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>)

La CI<sub>50</sub> fue calculada a partir de los porcentajes de inhibición de la actividad de AChE de los organismos que sobrevivieron a la exposición del tóxico en el experimento anterior (Tabla 7)

El análisis realizado, muestra que el ojo presentó el mayor porcentaje de inhibición, el cual alcanzo el 92%, mientras que en músculo se registro un 74% de inhibición. La determinación de CI<sub>50</sub> fue realizada mediante análisis Probit por el método anteriormente descrito, los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración Inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) del camarón blanco expuesto a metamidofos a partir de porcentaje de inhibición

Concentración mg l <sup>-1</sup>	% de inhibición		CI <sub>50</sub> – 96 horas	
	músculo	ojo	músculo	ojo
0.296	19	39	0.798	0.518
0.526	48	55	(0.656 – 0.949)*	(0.405 – 0.624)*
0.936	58	53		
1.24	60	70		
1.65	71	77		
2.96	72	92		

\* Intervalo de confianza P(<0.05).

Los porcentajes de inhibición determinados en este experimento se presentan en la Figura 19, donde se observa que la inhibición aumenta en ambos tejidos, conforme se incrementa la concentración y que los porcentajes de inhibición en ojo fueron consistentemente mayores que en músculo. Esta respuesta es dependiente de la dosis.

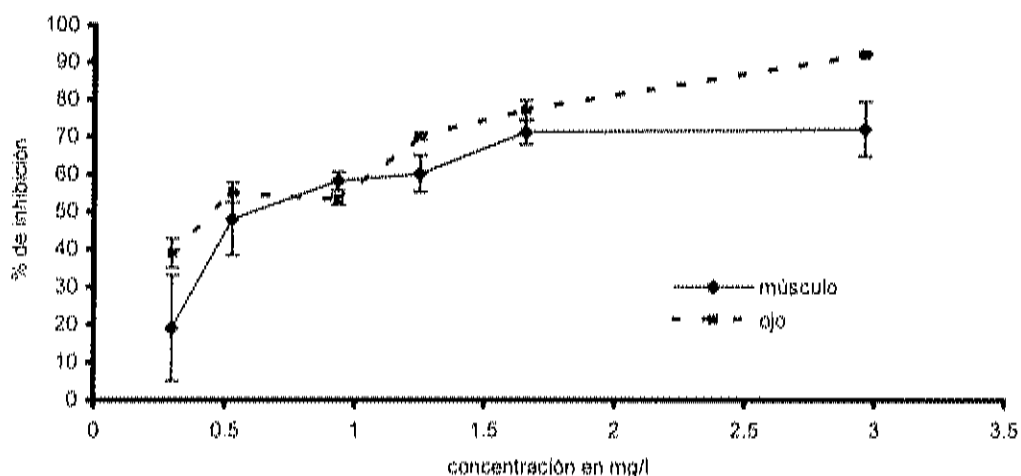


Figura 19. Porcentajes de inhibición de la actividad de la AChE presente en camarón blanco después de 96h de ser expuestos a metamidofos.

La actividad de AChE registrada en músculo de organismos expuestos a la máxima concentración fue aproximadamente dos veces menor respecto al control. Por otro lado, la actividad de AChE en ojo resultó 30 veces menor al control en la misma concentración.

La comparación múltiple de promedios Dunnett's, encontró diferencias significativas en músculo expuesto a las concentraciones de 1.659 y 2.963 mg l<sup>-1</sup> con respecto al control. En ojo las diferencias encontradas por el mismo método fueron en las concentraciones de 1.248, 1.659 y 2.963 mg l<sup>-1</sup> respecto al control ( $P < 0.05$ ).

### 5.2.2 Inhibición de AChE por exposición subletal a metamidofos.

En este experimento los organismos utilizados presentaron una longitud promedio de  $4.54 \pm 0.11$  cm y un peso de  $0.49 \pm 0.04$  gramos. En la exposición a diferentes concentraciones subletales de metamidofos, se observó que el porcentaje de inhibición al tiempo 6 fue mayor en comparación con organismos que estuvieron expuestos al tiempo de 24 y 48 h. Esta tendencia fue similar en ambos tejidos analizados. La inhibición de AChE en ojo fue similar a la obtenida en músculo. Sin embargo, en músculo no se encontraron diferencias significativas en cada tiempo analizado respecto a su control, mientras que en ojo solo al tiempo de 96 h se encontraron diferencias significativas respecto al control en las tres concentraciones subletales a una  $P < 0.05$  (prueba Dunnett's). La tendencia en la actividad de AChE presente en ambos tejidos se muestra en las Figuras 20 y 21.

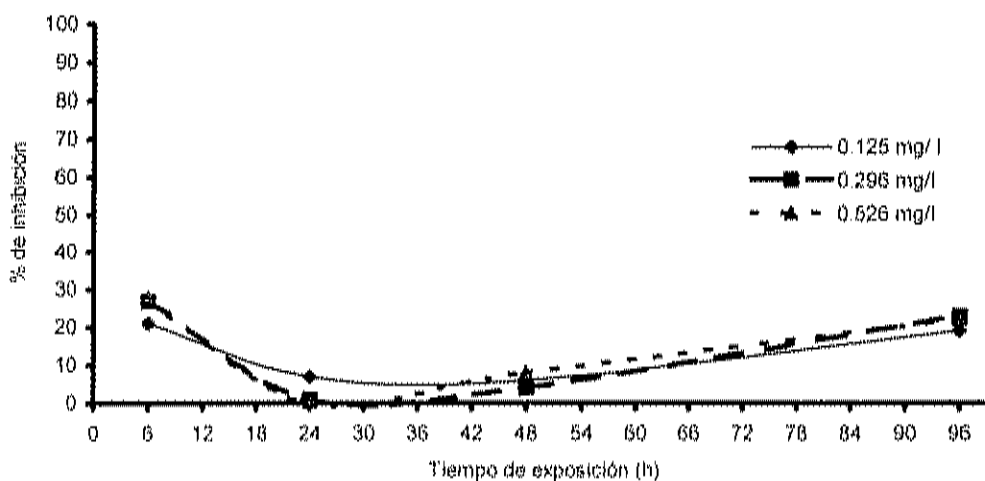


Figura 20. Inhibición de actividad de AChE en músculo expuesto a concentraciones subletales de metamidofos y a diferentes tiempos de exposición. Los valores son promedio de un cuatuplicado por organismo en cada tiempo y por cada concentración de metamidofos.

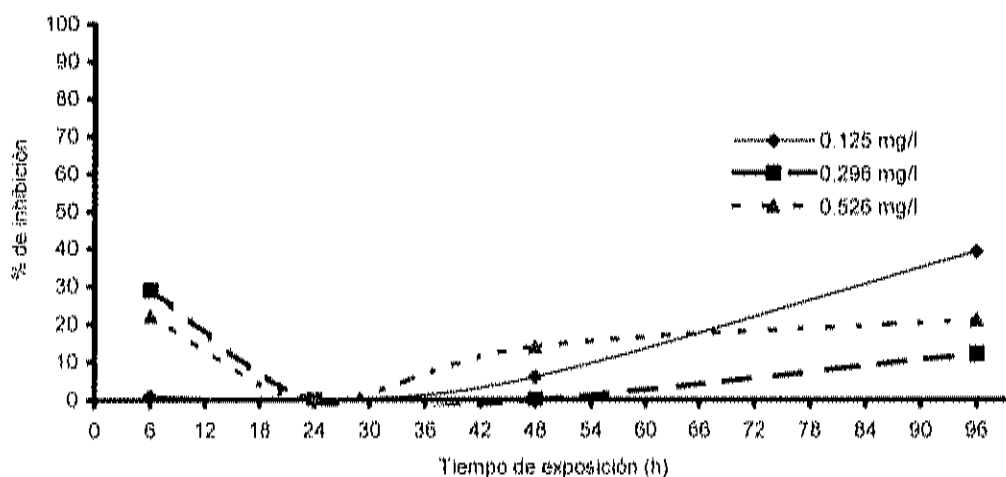


Figura 21. Inhibición de actividad de AChE en ojo expuesto a concentraciones subletales de metamidofos en diferentes tiempos de exposición. Los valores son promedio de un cuatriplicado por organismo en cada tiempo y por cada concentración de metamidofos.

### 5.2.3 Recuperación de la actividad de AChE

En esta fase del experimento, los organismos no presentaron los efectos característicos tóxicos del metamidofos (hiperactividad, nado errático, movimientos involuntarios etc.), además que en ningún tratamiento se detectó mortalidad a pesar de que se mantuvieron en un largo período de tiempo experimental sin alimento (240 h).

Los valores de actividad de AChE en músculo fluctuaron entre 1.6 y 4.1  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . De acuerdo al método de comparación de promedios Dunnett's ( $P < 0.05$ ), los valores de actividad de AChE en músculo al tiempo de 240 h, no mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de 0.125  $\text{mg l}^{-1}$  y 0.296  $\text{mg l}^{-1}$ , respecto al control, mientras que la concentración de 0.526  $\text{mg l}^{-1}$  mostró diferencias significativas respecto al control, lo cual podría reflejar la nula recuperación de la

actividad de acetilcolinesterasa en la máxima concentración ensayada (Figura 22).

Respecto al ojo, las actividades de AChE fluctuaron entre 15 y 30  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Al tiempo de 240 horas se observó en ojo una recuperación de la actividad de acetilcolinesterasa más acentuada que en músculo, las tendencias obtenidas fueron similares a la presentada en músculo. Los valores de actividad de AChE encontrados en ojo expuestos a 0.125 y 0.296  $\text{mg l}^{-1}$  al tiempo de 240 horas, no mostraron diferencias significativas respecto al control, solo los valores obtenidos en la concentración de 0.526  $\text{mg l}^{-1}$  resultaron ser significativamente diferentes del control. Estadísticamente no se aprecia recuperación de la actividad enzimática en la máxima concentración subletal de metamidofos en ambos tejidos analizados. (Figura 22 y 23).

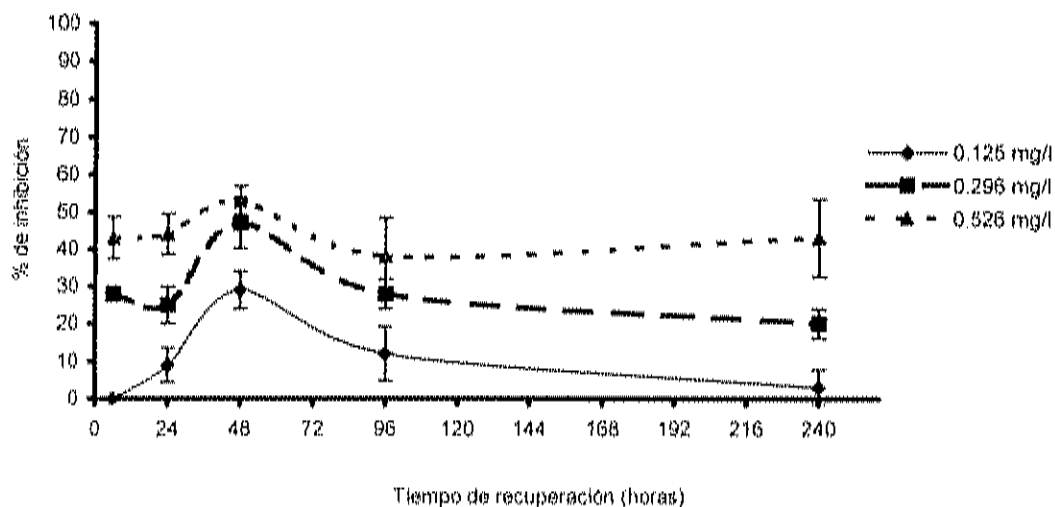


Figura 22. Recuperación en porcentaje de inhibición de la actividad de AChE presente en músculo, posterior a un periodo de exposición a concentraciones subletales de metamidofos.



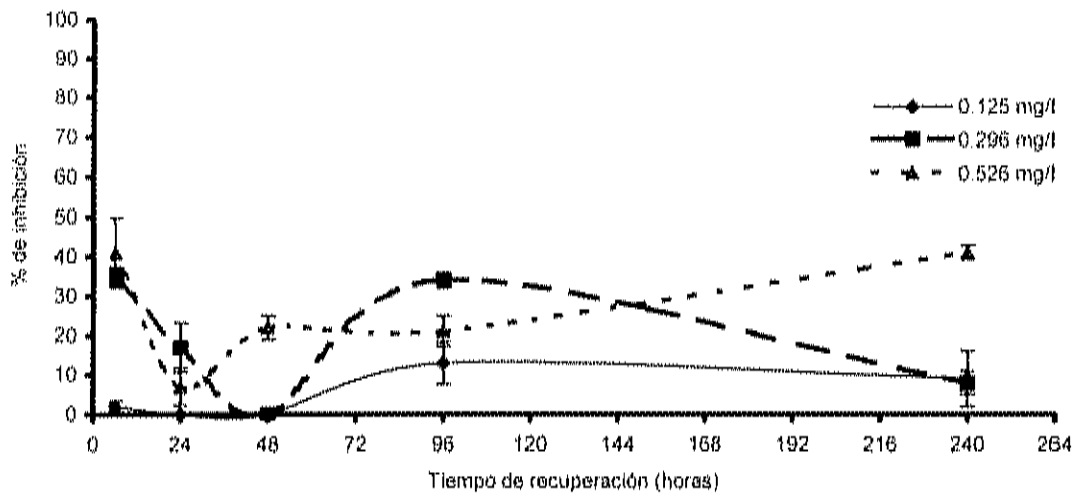


Figura 23. Recuperación en porcentaje de inhibición de la actividad de AChE presente en ojo, posterior a un periodo de exposición a concentraciones subletales de metamidofos.

## 6. DISCUSION

El malatión, metamídfos y diazinón son insecticidas organofosforados (OF) que se utilizan a gran escala para el combate de plagas en los cultivos agrícolas en el estado de Sinaloa. El malatión es a la fecha uno de los más estudiados en cuanto a sus efectos sobre organismos no blanco y sobre el ambiente. La toxicidad de los plaguicidas depende en la mayoría de los casos, de la estructura química del compuesto, del tiempo de exposición, de parámetros físicos y químicos y de la susceptibilidad de las especies. Para evaluar el efecto tóxico de los insecticidas se han llevado a cabo pruebas de toxicidad aguda y crónicas. En organismos sensibles como el camarón se ha reportado una concentración letal media de  $38.19 \mu\text{g l}^{-1}$  de malatión en *Palaemonetes pugio* (Coppage y Matthews, 1974).

Para conocer el efecto causado por OF a nivel bioquímico en invertebrados, se ha utilizado la medición de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE), siendo uno de los biomarcadores más utilizados ( Abdullah *et al.*, 1994; Nath y Kumar, 1999; Scaps y Borot, 2000; Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2000 ). Los biomarcadores, deben de responder a los contaminantes en forma dependiente de la dosis o concentración de un contaminante ambiental. La inhibición de la acetilcolinesterasa es la respuesta biológica que se utiliza para el monitoreo en campo de residuos químicos como los organofosforados y carbamatos que son introducidos deliberadamente al ambiente, y que representan un gran riesgo de contaminación ambiental (Peakall, 1992). Por ejemplo, el malatión a una concentración de  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  se ha observado que inhibe la actividad de AChE un 75% en camarón *Penaeus duorarum* (Coppage y Matthews, 1974).

En este trabajo realizado en laboratorio los porcentajes de inhibición de la actividad de AChE en ambos tejidos (músculo y ojo) resultaron diferentes y también lo fueron con cada uno de los tóxicos utilizados. La inhibición siempre fue mayor en ojo que en músculo. Del mismo modo, los porcentajes de inhibición en los diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo* fueron dependientes de la concentración del plaguicida.

## EXPERIMENTOS *in vitro*

La medición *in vitro* de la actividad de acetilcolinesterasa, se ha propuesto como un biomarcador de gran utilidad a nivel mundial (Guilhermino *et al.*, 1996; Escartín, 1999). Su utilidad se basa a que son usualmente más fáciles de manipular, controlar, son más rápidos y produce menos desecho de agua con tóxico, que las pruebas agudas *in vivo*.

Para utilizar la actividad de acetilcolinesterasa como biomarcador, primeramente se debe realizar la caracterización de la colinesterasa presente en el organismo o tejido de estudio, ya que los tejidos pueden tener grandes cantidades de esterases no específicas. Para esto se utilizaron diferentes sustratos e inhibidores específicos. En este experimento la caracterización se realizó con músculo y ojo del crustáceo (*Litopenaeus vannamei*).

Los resultados obtenidos en la caracterización demuestran que la actividad de AChE en el sustrato de ATC fue mayor en ojo ( $35.368 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína) que en músculo ( $4.826 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína). El patrón de actividad de colinesterasa para ATC y PTC fue similar, mientras que para BTC la velocidad de hidrólisis determinada fue tres veces menor en músculo y 34 veces menor en ojo, comparada con los otros dos sustratos ensayados. La baja actividad de la colinesterasa con el sustrato butiriltocolina, demuestra que no es un sustrato apropiado o específico para la cuantificación de actividad de la acetilcolinesterasa. La acetilcolina hidrolizó acetiltocolina más rápidamente que propioniltocolina y butiriltocolina. Este mismo orden de hidrólisis se ha observado en la caracterización realizada con el copépodo *Tigriopus brevicornis* (Forget y Bocquené, 1999), y similarmente con el crustáceo *Palaemon serratus*, además en esta especie de *serratus*, la actividad de acetilcolinesterasa fue mayor cuando se analizó en músculo y valores menores se determinaron con animal completo y con hepatopáncreas (Bocquené *et al.*, 1990).

En este trabajo se determinó que en ojo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), las actividades de las colinesterasas fueron en general, mucho mayores que en músculo. En los substratos ATC y PTC estas diferencias fueron de aproximadamente entre cinco y siete veces. Para BTC no hubo gran diferencia en ambos tejidos. Con las altas actividades determinadas en ATC, se puede decir que el ojo del camarón blanco, puede ser un buen tejido de estudio ya que presentan gran cantidad de colinesterasa.

Actividades altas de colinesterasa con el substrato ATC se han determinado en diferentes especies, por ejemplo, en el invertebrado *Sepia officinalis* (Bellanger *et al.*, 1998), y en peces de agua dulce *Poecilia reticulata* (García *et al.*, 2000), así como también en ostiones *Crassostrea gigas* y en poliquetos *Nereis sp* (Bocquené *et al.*, 1990). En la mayoría de los estudios anteriormente mencionados, así como también en este estudio desarrollado con *Litopenaeus vannamei*, se observó una mayor afinidad de la colinesterasa con el substrato de acetiltiocolina.

Una vez que se ha comprobado que la enzima cuantificada ha sido la colinesterasa, esto debe corroborarse con la utilización de inhibidores específicos y comprobar que la enzima inhibida sea la AChE. En este estudio se observó que el sulfato de eserina fue el inhibidor que más afectó la actividad de AChE, seguido por el BW284c51 que se sabe que es un inhibidor reversible de acetilcolinesterasa. Por el contrario con iso-OMPA, a pesar de haber utilizado concentraciones considerablemente altas (aproximadamente 80 veces más altas que las utilizadas en sulfato de eserina y BW284c51), no tuvo una significativa inhibición en músculo.

En el caso del ojo, si se obtuvo una inhibición, que al parecer se puede tratar de otra esterasa que contiene serina y que podría estar presente en ojo de camarón, ya que el iso-OMPA no es un inhibidor específico de acetilcolinesterasa (Takahashi *et al.*, 1983, 1987) pero sí un inhibidor de carboxilesterasa y butirilcolinesterasas que están regularmente presentes en plasma de invertebrados y vertebrados (Walker y Thompson, 1991; Bocquené, 1997). La inhibición de AChE en ojo de *Litopenaeus vannamei* en presencia de eserina y BW284c51 fue cerca de 99%, mientras que en

músculo los porcentajes fueron menores al 90% en ambos casos. De esta manera se observó que estos dos inhibidores son específicos de acetilcolinesterasa. Dichos porcentajes de inhibición resultaron similares al ocasionado por el inhibidor BW284c51 en *Artemia salina* de 72 horas de vida, el cual fue del 100% ( Barahona y Fortún, 1999 ).

Una vez que se ha caracterizado la colinesterasa presente en ojo y músculo del camarón blanco y que se ha comprobado que en realidad la actividad de acetilcolinesterasa se inhibe en presencia de inhibidores específicos, es necesario comprobar si los plaguicidas organofosforados utilizados en este estudio inhiben de igual forma la actividad de acetilcolinesterasa *in vitro* e *in vivo* en músculo y ojo del camarón blanco.

En el presente trabajo, el malatión ocasionó una inhibición de la actividad de AChE considerable en juveniles de *Lilopenaeus vannamei*, la inhibición *in vitro* de actividad de AChE determinada en músculo en la máxima concentración de malatión ( $0.003 \text{ mg ml}^{-1}$ ) fue del 82% y en ojo del 92%. El diazinón también es un insecticida que ha sido evaluado sobre una variedad de organismos no blanco. En postlarvas de camarón *Penaeus japonicus* se ha observado que la concentración inhibitoria media del diazinón de las formas oxón respecto a las formas tión es 832 veces menor (Kobayashi *et al.*, 1991). En el presente estudio, el diazinón a pesar de que se utilizaron concentraciones ligeramente mayores, se tuvo un 27% de inhibición en músculo y 67% en ojo. Por su parte, el metamidofos es un insecticida sistémico que a pesar de ser utilizado en gran medida en cultivos agrícolas, sus efectos tóxicos sobre organismos acuáticos no se conocen suficientemente, ya que su estudio se ha limitado a la cuantificación de residuos en aire (González *et al.*, 1998), agua (Yei-Shung *et al.*, 2000), sedimento e incluso en tejidos de mamíferos (Spassova *et al.*, 2000). En este estudio realizado se observó que el efecto del metamidofos sobre el camarón blanco a la máxima concentración ( $0.0045 \text{ mg ml}^{-1}$ ), inhibió en músculo un 57% y en ojo el 76%. El resultado generado demuestra que la inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa fue dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementó la concentración de plaguicida el efecto de inhibición fue mayor. Tendencias similares fueron observadas

en músculo y ojo. Este efecto dosis dependiente, mayormente fue observado con metamidofos y malatión.

Existe gran diversidad de estudios de exposición a insecticidas organofosforados, por ejemplo, a una concentración de 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  de profenofos (organofosforado ampliamente utilizado en Australia) se observó que ocasionó una inhibición del 97% en la actividad de AChE del camarón *Paratya australiensis* (Abdullah *et al.*, 1994). Por otro lado, el langostino *Procambarus clarkii* tuvo un 55% de inhibición de la actividad de AChE, cuando fueron expuestos a 200  $\mu\text{g l}^{-1}$  de fenitrotión (Escartín y Porte, 1996). En este estudio realizado con *Litopenaeus vannamei* se determinó que el metamidofos, malatión y diazinón producen un efecto de inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa similar a los plaguicidas organofosforados anteriormente mencionados, esto a pesar de haberse utilizado concentraciones menores, dicho efecto fue mayor en ojo que en músculo de camarón blanco

Una vez comprobado que la actividad de AChE presente en camarón blanco se inhibe en presencia de plaguicidas organofosforados en diferente grado según el tipo de plaguicida utilizado, se puede sugerir que el camarón blanco puede ser un buen candidato como un organismo indicador, y que la utilización de la actividad *in vitro* de AChE presente en ojo sería el tejido más apropiado para el análisis, por presentar una gran cantidad de actividad de acetilcolinesterasa.

En la mayoría de los experimentos de toxicidad *in vitro* realizados a nivel mundial, se utilizan plaguicidas grado técnico con un alto porcentaje de ingrediente activo. En este trabajo se utilizaron tres distintas presentaciones de metamidofos, con la finalidad de conocer su efecto de inhibición sobre la actividad de AChE en músculo y ojo de camarón blanco. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición del metamidofos comercial fue ligeramente mayor comparado con el técnico y el estándar, esto significa que a pesar de tener un porcentaje de ingrediente activo menor, que la presentación del metamidofos grado técnico y el grado estándar, su efecto sobre la inhibición de la actividad de la AChE es mayor.

Sailatha *et al.* (1981) y Scott *et al.* (1987) mencionan que el incremento del efecto tóxico del producto puede atribuirse a los concentrados emulsificables y subproductos inertes utilizados en la elaboración de los productos comerciales que en la mayoría de los casos resultan más tóxicos que el mismo ingrediente activo.

### EXPERIMENTOS *in vivo*

En general, en los crustáceos, la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del metamidofos es inferior a las reportadas para peces. En este experimento después de un período de 96 horas de exposición de juveniles de *Litopenaeus vannamei* al metamidofos, la CL<sub>50</sub>-96 horas determinada fue de 1.67 mg l<sup>-1</sup>, (1.44 ± 1.99). En un estudio realizado con crustáceos *Litopenaeus stylirostris* en etapa misis, la CL<sub>50</sub>-24 h del metamidofos determinada fue de 0.16 mg l<sup>-1</sup> (Juárez y Sánchez, 1989). Las etapas de las dos diferentes especies del camarón mostraron una respuesta diferente al tóxico en diferente tiempo de exposición, por lo que se puede decir que la susceptibilidad al tóxico varía de acuerdo a la etapa de los organismos. Regularmente la etapa postlarva es más sensible a las perturbaciones ambientales que la etapa juvenil y adulta (Epifanio, 1979). El efecto tóxico agudo obtenido en juveniles de camarón blanco, comprueba lo anteriormente mencionado, ya que al comparar las CL<sub>50</sub> obtenidas en la etapa juvenil con la etapa misis de la especie de camarón estudiada por Juárez y Sánchez, (1989), se puede decir que la etapa misis de camarón azul resultó ser aproximadamente 10 veces más susceptible al tóxico que la etapa juvenil del camarón blanco.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del metamidofos en las especies de crustáceos fue menor, comparadas con la CL<sub>50</sub> de 51 mg l<sup>-1</sup> de metamidofos determinada por (Meister, 1995) para peces (truchas), esto demuestra una mayor sensibilidad de los crustáceos a este compuesto químico que los peces.

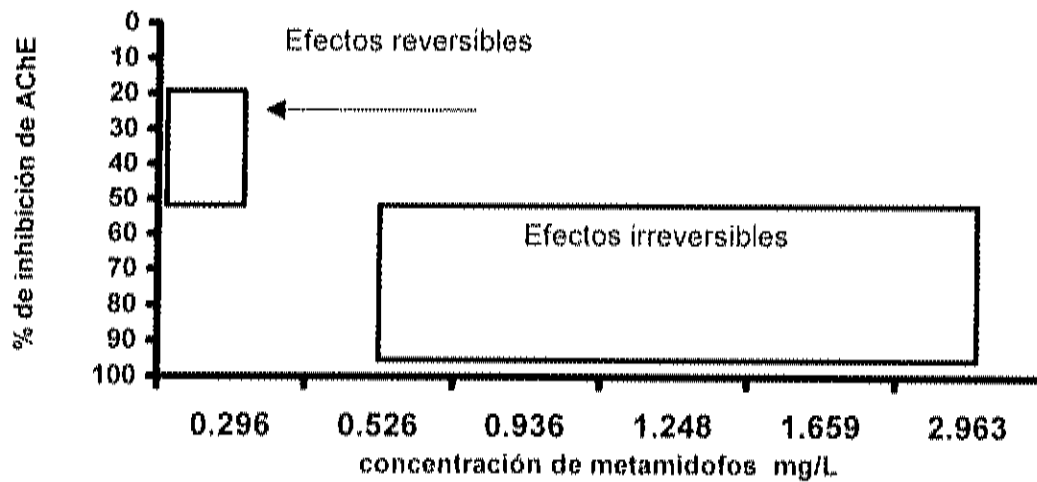
Los efectos letales agudos del metamidofos sobre juveniles de camarón blanco fueron observables durante el tiempo en el que fueron expuestos, presentando primeramente una hiperactividad, posteriormente movimientos natatorios no-coordinados y finalmente en algunos casos la muerte, esto coincide a lo observado por Reddy y Rao (1990).

Posteriormente a los efectos anteriormente mencionados se calculó la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) en ojo, fue de  $0.518 \text{ mg l}^{-1}$  ( $0.405 \pm 0.624$ ) y en músculo  $0.798 \text{ mg l}^{-1}$  ( $1.17 \pm 1.64$ ). Lo que indica que los organismos expuestos sufren un 50% de inhibición de la actividad de la AChE a las concentraciones mencionadas. Se ha considerado que una reducción de la actividad de AChE del 20% es indicativa de exposición a insecticidas organofosforados (Day y Scott, 1990) y que una inhibición del 30 al 50 % ha sido correlacionada con el efecto del tóxico (Edwards y Fisher, 1991).

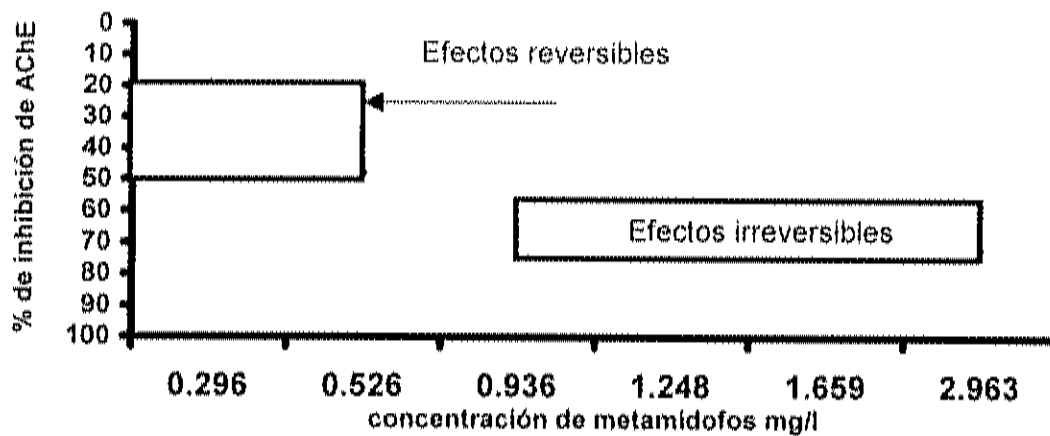
En base a los porcentajes de inhibición de la actividad de AChE del metamidofos sobre los organismos expuestos en el experimento de exposición letal, se determinaron las concentraciones en las cuales se detectan los porcentajes de riesgo o zonas de efecto, tanto en ojo como en músculo. Las zonas de efectos irreversibles fueron mucho más amplias en lo que respecta al ojo, mientras que en músculo la zona fue de una amplitud menor. Cabe mencionar que estas zonas de efectos son específicamente para el metamidofos y para la especie de crustáceo expuesto al tóxico organofosforado mencionado.

Al graficar los porcentajes de inhibición (como se muestran en la siguientes figuras), se puede decir que para el músculo tan sólo se necesita una concentración de  $0.296 \text{ mg l}^{-1}$  del metamidofos para obtener una inhibición del 20 %, mientras que en ojo a esa misma concentración, se encuentra un 50% de inhibición con posible riesgo de mortalidad.





La zona de efectos reversibles resultó ser menor en ojo, la cual corresponde a una concentración de  $0.296 \text{ mg l}^{-1}$ , mientras que en músculo, la zona de efectos reversibles, se detectó a la concentración de  $0.526 \text{ mg l}^{-1}$ . La zona de variación normal (menor al 20 % de inhibición) no se detecta por los altos valores de inhibición de AChE en ambos tejidos.



En músculo (como se muestra en la figura anterior), a una concentración de metamidofos de  $0.936 \text{ mg l}^{-1}$  ocasionó más del 50 % de inhibición de AChE en músculo, lo cual podría poner en riesgo los organismos expuestos a dicha concentración de metamidofos, de acuerdo a lo establecido por Day y Scott (1990).

Por otro lado, los organismos expuestos a concentraciones subletales de metamidofos comercial no tuvieron en músculo un efecto considerable a nivel bioquímico respecto a la inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa, mientras que en ojo si se observó una significativa inhibición de la actividad de AChE comparada con el grupo control, esta diferencia fue más significativa al tiempo de 96 horas de exposición en las tres concentraciones subletales ensayadas.

Con lo anteriormente mencionado, se ha comprobado que el efecto de inhibición del metamidofos sobre la actividad de AChE del camarón blanco es generalmente menor a concentraciones subletales, sin embargo, este efecto es perceptible bioquímicamente.

La recuperación espontánea o natural de la actividad de AChE posterior a la exposición del metamidofos, se puede interpretar como un incremento de la actividad de la enzima después de finalizar la exposición del agente anticolinesterasa. En el experimento de *Litopenaeus vannamei*, la recuperación de la actividad de AChE, no fue significativa en organismos que estuvieron expuestos a la concentración subletal de metamidofos de  $0.526 \text{ mg l}^{-1}$ . El análisis estadístico aplicado a los valores de la actividad de AChE presente tanto en ojo como en músculo de camarón, no encontró diferencias significativas entre el control y los tratamientos de  $0.125$  y  $0.296 \text{ mg l}^{-1}$ , mientras que en el tratamiento de  $0.526 \text{ mg l}^{-1}$  las diferencias fueron significativas respecto al control. La recuperación parcial en  $0.125$  y  $0.296 \text{ mg l}^{-1}$  fue determinada al tiempo de 240 horas posterior a la exposición. La recuperación de la actividad de AChE de manera natural, ha sido reportada para otras especies de invertebrados y vertebrados. Reddy y Rao (1988), reportan recuperación de la actividad de AChE, en penéidos *Metapenaeus monoceros* a 168 horas después de haber sido expuestos a fosfamidón y metilparatión. Por otro lado, Sancho *et al.* (2000) reportan que en el pez *Anguilla anguilla* se tuvo una recuperación parcial de AChE en condiciones naturales a

192 y 298 horas después de haber sido expuestos al herbicida tiobancarb.

La actividad de AChE puede ser utilizada para evaluar los efectos ocasionados por los insecticidas organofosforados (OF), ya que los experimentos realizados en este estudio muestran tendencias de inhibición de AChE en el organismo prueba (*Litopenaeus vannamei*). De igual forma, se han observado efectos de inhibición ocasionados por insecticidas OF sobre etapas embrionarias en camarón *Palaemonetes pugio* (Shannon *et al.*, 2000), así como también se ha utilizado la inhibición de la actividad de AChE para evaluar metabolitos de OF en formas-oxón y formas-tiono en larvas de camarón *Penaeus japonicus* (Kobayashi *et al.*, 1991). En las tres especies de crustáceos mencionadas, la inhibición de la actividad de AChE determinada ha sido significativa, lo cual hace a los crustáceos organismos muy sensibles a plaguicidas organofosforados (Galgani y Bocquené, 1990; Edwards y Fisher, 1991; Escartin y Porte, 1996).

Por los resultados obtenidos, se ve claramente que del camarón blanco, el ojo resultó ser un tejido más sensible a la presencia de plaguicidas organofosforados que el músculo. Esto también se ha observado en un estudio con el pez *Anguilla anguilla* (Sancho, *et al.*, 2000), lo cual posiblemente se deba a que la retina presenta una alta actividad nerviosa, además, en la cornea, iris y nervio óptico existen pequeñas cantidades de acetilcolina, lo cual hace a este tejido un importante biomarcador de plaguicidas organofosforados (Harlin, 1991).

## 7. CONCLUSIONES

- En los tejidos estudiados la Km fue menor para acetiltiocolina que para propioniltiocolina y butiriltiocolina, lo que significa que hay mayor afinidad de este sustrato por la colinesterasa presente en camarón blanco (*L. vannamei*).
- La actividad de AChE fue inhibida cuando se emplearon inhibidores específicos como el sulfato de eserina y BW284c51. Por el contrario, con el inhibidor iso-OMPA la inhibición fue de menor magnitud en ambos tejidos. Comprobándose con esto que la colinesterasa presente en camarón blanco fue la AChE.
- También se obtuvo una inhibición de la actividad de AChE con los plaguicidas organofosforados; malatión, metamidofos y diazinón. Siendo esta inhibición muy alta para malatión y metamidofos, la más baja se presentó con el diazinón.
- El metamidofos grado comercial ejerce un efecto mayor de inhibición sobre la actividad *in vitro* de AChE, a pesar de contar con un porcentaje menor de ingrediente activo, comparado con el grado estándar y el técnico que tienen un porcentaje mayor de ingrediente activo.
- La CL<sub>50</sub> – 96 h del metamidofos grado comercial, sobre camarón blanco en etapa juvenil fue de  $1.67 \pm (1.44 - 1.99 \text{ mg.l}^{-1})$ , durante la exposición al tóxico los organismos presentaron hiperactividad, movimientos natatorios incoordinados y una coloración blanquecina poco antes de morir.
- La CI<sub>70</sub> en ojo fue aproximadamente dos veces menor que la CL<sub>50</sub> – 96 h, lo que indica que la respuesta bioquímica se detecta a una concentración inferior a la CL<sub>50</sub>. Concluyendo con esto que la respuesta bioquímica encontrada en ojo fue mejor que la obtenida en músculo, por lo que el ojo puede ser un buen indicador de exposición a plaguicidas organofosforados.

- Con la utilización de concentraciones subletales de metamidofos grado comercial, la actividad de AChE disminuyó conforme aumentó el tiempo de exposición. Solo en los valores del ojo, se observaron diferencias significativas en el efecto de inhibición respecto al control y al tiempo de 96 horas las diferencias significativas fueron encontradas en los valores de todas las concentraciones ensayadas (prueba Dunnett's  $P \leq 0.05$ ).
- Después de un periodo de exposición de 96 h, seguidamente de 240 horas de no exposición, se observó una recuperación de la actividad de AChE, tanto en ojo como en músculo. Sólo en la concentración más alta para ambos tejidos, la recuperación resultó ser significativamente diferente al control (Dunnett's test  $P \leq 0.05$ ).
- Los resultados indican importantes diferencias en los niveles de actividad y sensibilidad de la AChE con relación al tejido estudiado. En todos los experimentos realizados el ojo fue el que mostró mayor actividad y mayor inhibición que el músculo. Esto podría ser relevante para la utilización de la actividad de AChE como biomarcador de alerta temprana de exposición a plaguicidas organofosforados en organismos acuáticos en estudios de campo.

## 8. BIBLIOGRAFIA

**Abel, P. D. y Axiak, V.** (1991). *Ecotoxicology and the marine environment*. Ellis Horwood Books in Water and Wastewater Technology. 269 p.

**Albert, L. A., R. Loera Gallardo y C. Bárcenas** (1996). Química y ecotoxicología de los insecticidas, p 125 – 137. En: A.V. Botello, J. L. Rojas Galaviz, J.A. Benítez y D Zárate Lomeli (Eds) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX serie científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.

**Albert, L. A. y Benítez, J. A.** (1996). Impacto Ambiental de los plaguicidas en los ecosistemas costeros, p 107 – 123. En: A.V. Botello, J. L. Rojas Galaviz, J. A. Benítez y D. Zárate Lomeli (Eds) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX serie científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.

**Abdullah, A. R., Kumar, A., Chapman, J. C.** (1994). Inhibition of acetylcholinesterase in the australian freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) by profenofos. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 13 No. 11 1861-1866.

**Bellanguer, C., Dauphin, F., Belzunces, L. P. y Chichery, R.** (1998). Parallel regional quantification of choline acetyltransferase and Cholinesterase activity in the central nervous system of an invertebrate (*Sepia officinalis*). *Brain Research Protocols*. **3**: 68-75

**Barahona, M. y Sanchez-Fortun, S.** (1999). Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and effect of atropine, BW284c5, iso-OMPA y 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution*. **104**: 469-476

**Bocquené, G. y Galgani, F.** (1991). Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminate by carbaryl and phosalone: choice of a method for detection of effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **22** : 337 – 344

**Bocquené, G., Roig, A., Fournier, D.** (1997). Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. Federation of European Biochemical Societies (FEBS ). FEBS Letters **00**: 1 - 6

**Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P.** (1990). Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. Marine Environmental Research **30** : 75 - 89

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

**Carvalho, F. P. y Hance, R. J.** (1993). Boletín. Protección de los mares. Vol. 35, No. 2, pp 64. Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA).

**Carvalho, F.P., Fowler, S.W., Gonzalez-Farias, F., Mee, L. D. y Readman, J. W.** (1996). Agrochemical residues in the Altata-Ensenada del Pabellon coastal lagoon (Sinaloa, Mexico): a need for integrated coastal zone management. International Journal of Environmental Health Research **6** : 209 - 220.

**Calow, P.** (1993). Handbook of Ecotoxicology. Vol I, Blackwell Scientific Publications. pp 478.

**CICOPLAFEST** (1998). Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR, SSA. 519 p

**Chin, N. Y., Sudderuddin, I. K.** (1979) Environment Pollution 18: 213 – 220. En Mineau 1991. Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment. Chemicals in Agricultura Vol 2. pp. 384

**Contreras, F.** (1984). Las lagunas costeras mexicanas. Centro de Ecodesarrollo, Secretaría de Pesca. pp. 253

**Coppage, D. L. y Mathews, E.** (1974). Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **11**:5, p 483-488.

**Couch, J.** (1979). Shrimps (Arthropoda: crustacea: Penaeidae) En: *Pollution Ecology of Estuarine Invertebrates*. Academic Press. **7** : 235-258

**Conte y Parker** (1975) En Couch, J. 1979. Shrimps (Arthropoda: crustacea: Penaeidae) En: *Pollution Ecology of Estuarine Invertebrates*. Academic Press. **7** : 235-258

**Day, K. y Scott, I. M.** (1990). Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicology* **18**:101-114

**Dauberschmidt, C., Dietrich, D. R. y Schlatter, C.** (1997). Esterases in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: activities, inhibition, and binding to organophosphates. *Aquatic Toxicology*. **37**:295-305

**Depledge, M. H. y Fossi, M. C.** (1994). The role of biomarkers in environmental assesment (2). *Invertebrates Ecotoxicology*. **3**: 161-172

**Derosa, K. y Stara, J.** (1988). Malatión: Efectos sobre la salud y el ambiente. Agencia de Protección del Ambiente (EPA). Organización Mundial de la Salud (OMS). pp 66

**Ellman, L. G., Courtney, D. K., Valentino, A. y Featherstone, M. R.** (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. **7** : 89 – 95

**EPA** (1989) U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide Environmental Fate One Line Summary Methamidophos. U.S. EPA Environmental Fate and Effects Division. Washington, DC. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/index.html>



**Edwards, C. A. y Fisher, W.** (1991). The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. 255-271. En: Cholinesterase-inhibiting insecticides their impact on wildlife and the environment. Edited by Piere Mineau. Chemicals in Agriculture, vol 2. ed. Elsevier.

**Escartín, E. y Porte, C.** (1996). Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **34**: 160 – 164.

**Escartín, E. y Porte, C.** (1997). The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 10, 2090-2095.

**Escartín, E.** (1999). Utilització de bioindicadors per a la vigilància de la contaminació ambiental del Mediterrani nord-occidental. Tesis Doctoral. Facultat de Química. Universidad de Barcelona. pp 269

**Espina, S y C. Vanegas.** (1996). Ecotoxicología y contaminación, p. 69-106. En : A. V. Botello, J.L. Rojas Galaviz, J.A. Benítez y D. Zárate Lomell (Eds). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias. EPOMEX. Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México. 666 p.

**Epifanio, C. E.** (1979). Larval decapods (Arthropoda: crustacea: decapoda) En: *Pollution Ecology of Estuarine Invertebrates*. Academic Press. 8 : 259-292

**FAO** (1981). Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4°. Base para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. Pesca, (164) : 34 p.

**Finney, D.J.** (1971). Probit analysis. 3<sup>rd</sup> ed, Cambridge Univ. Press, New York, 668 p

**Fossi, M. C., Lari, L. y Casini, S.** (1996). Interspecies variation of "B" esterases in birds: the influence of size and feedings habits. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31** : 525 - 532

- Forget, J., Bocquené, G.** (1999). Partial purification and enzymatic characterization of acetylcholinesterase from the intertidal marine copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 123: 345 – 350
- Galgani, F. y Bocquené, G.** (1990). In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 45 : 243 – 249.
- Galgani, F., Bocquené, G., Burgeot, T., Dean, L. y Truquet, P.** (1993). Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 26: 2, 101 – 105.
- Galindo, G., Medina, M., Villagrana, C. y Ibarra, L.** (1997). Environmental and pollution condition of the Huizache-Caimanero lagoon, in the north-west of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 34:12 1072-1077.
- Garcia, L. M., Castro, B., Ribeiro, R. Guilhermino, L.** (2000). Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its *in vitro* inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers*, Vol. 5 No. 4, 274-284.
- Gonzalez-Farias, F., Carvalho, P. F, Fowler, W. S., Mee, L. D.** (1997). A tropical coastal lagoon affected by agricultural activities. The importance of radiolabelled pesticide studies. *Environmental Behavior of Crop Protection Chemicals* Viena. IAEA-SM-343/31. 289 – 299
- Gonzalez, F. J., Vidal, J. L, Cano, M. L y Galera, M.** (1998). Levels of metamidophos in air and vegetables after greenhouse applications by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 829: 251 – 258.
- Guilhermino, L., Lopez, M. C., Carvalho, P. A., Soares, M. V.** (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute test with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 32:4 , pp727-738.
- Hart, L. G.** (1977). An introduction to pesticide degradation by aquatic organisms en *Pesticides in Aquatic Environments*. Editado por Khan Q.A.M. 167-170

**Habig, C. y Di Giulio, R.** (1991). Biochemical Characteristics of Cholinesterases in Aquatic Organisms. En: Mineau Cholinesterases-Inhibiting Insecticides. Vol. 2, pp 21 - 33

**Harlin, K.S.** (1991) En Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M. D. y Andreu-Moliner, E. (2000). Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **46**: 57-63.

**Herbert, A., Guilhermino, L., Assis de Silva, C. H. y Hansen, P. D.** (1995). Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*. **3**: 1 -15

**Hassall, K. A.** (1990). The Biochemistry and uses of pesticides. Structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. Second edition. p 536

**INEGI.** (1994). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática Estado de Sinaloa. Cuaderno Estadístico Municipal. "Guasave". Edición 1994, p 121.

**INEGI.** (1998). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática Estado de Sinaloa. Anuario Estadístico del Estado de Sinaloa. Edición 1997, p 402.

**INEGI.** (1999). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario estadístico del Estado de Sinaloa. p 414

**Jett, D. A., Navoa, R. V., y Lyons, M. A.** (1999). Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letters*. **105**: 223 – 229

**Jeyaratnam, J. y Maroni, M.** (1994). Organophosphorus compounds. *Toxicology*. **91**: 15 – 27.

**Juárez, L. y Sánchez, J.** (1989). Toxicity of the organophosphorous insecticide metamidophos (o,s-dimethyl phosphoramidothioate) to larvae of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de man) and the blue shrimp *penaeus stylirostris* Stimpson. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. **43** : 302 – 309

**Jui-Hung, Y., Kuo-Hsiung, L. y Yei-Shung, W.** (2000). Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater. Ecotoxicology and Environmental Safety. **45** : 79 – 86

**Koeman, J. H.** (1991). From comparative physiology to toxicological risk assesment. Comparative Biochemistry and Physiology. **100 C**: 7 – 10

**Kuhn, K. y Streit, B.** (1994). Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. **53**: 398-404.

**Kurelec, B., Btivic, S., Rijavec, M., Muller, W. E. G. y Zahn, R.K.** (1977). Benzo (a) pyrene monooxygenase induction in marine fish molecular response to oil pollution. Marine Biology. **44** : 211 – 216.

**Kobayashi, K., Rompas, R. M., Imada, N. Y Oshima, Y.** (1991). Mechanism of abrupt increase in toxicity of organophosphorothionates to tiger shrimp larvae with progress of stages. Water Science Technology. **23** : 487 – 496.

**Lari, L., Massi, A., Fossi, M. C., Casini, S., Leonzio, C. y Focardi, S.** (1994). Evaluation of toxic effects of the organophosphorus insecticide azinphos-methyl in experimentally and naturally exposed birds. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. **26** : 234 - 239.

**Leeuwen, C. J. y Hermens, J. L.** (1995). Risk assessment of chemicals an introduction. Kluwer Academic Publishers. 374 p

**Livingston, R.** (1977). Review of current literature concerning the acute and cronic effects of pesticides on aquatic organism. CRC critical reviews in environmental control. 325 – 351.

**Livingstone, D. R.** (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. En: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, vol.7. R. Gilles, Ed. Berlin: Springer-Verlag, Berlin. p 45-485.

**Lundebye, A. K., Curtis, T. M., Braven, J. y Depledge, M. H.** (1997). Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology*, **40**: 23 - 36

**Martínez, V. E. y Rodríguez, R. E.** (1997). Contaminación, contaminantes y ambiente. En: *Ciencia Ambiental y Desarrollo Sustentable*. Ed. Enkerlin, C.E.; Cano, G.; Garza, R. A.; Vogel, E. pp 371-383.

**Martínez, J. F.** (1993). Camaronicultura. C.I.C.T.U.S. Ed AGT, S.A. pp 233

**Martínez-Jerónimo, F.** (1991). La importancia de los bioensayos en la evaluación de la toxicidad acuática. *Universidad Ciencia y Tecnología*, **1** : 4:37 - 44.

**Meister, R. T.** (1995). *Farm chemicals handbook'95*. Meister Publishing company willoughby. [http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extornet/haloxifop\\_methylparathion/methamidophos\\_ext.html](http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extornet/haloxifop_methylparathion/methamidophos_ext.html).

**Nath, B. S. y Kumar, R. P. S.** (1999). Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **42** : 157 - 162.

**NOM-074-ECOL** (1994). Proyecto de norma oficial mexicana, que establece el método de prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (crustácea-cladocera). 22 p

**Olea, R. H.** (1975). *Ecología descriptiva de Sinaloa*. Sociedad Mexicana de Geografía y Estadística. 201 p.

**Páez-Ozuna, F., Guerrero-Galvan, S., y Ruiz-Fernández, A.** (1998). The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, Vol 36, No. 1, 65-75 pp

**Páez-Ozuna, F. y Tron-Mayén, L.** (1996). Concentration and distribution of heavy metals in tissues of wild and farmed shrimp *Penaeus vannamei* from the Northwest coast of Mexico. *Environment International* 22, 243-450

**Payne, J. F. y Penrose, W. R.** (1975). Induction of aryl hydrocarbon benzo (a) pyrene hydroxylase in fish by petroleum. *Bulletin Environmental and Toxicology* 14 : 112 - 116

**Payne, J. E., Mathieu, A., Melvin, W. y Fancey, L. L.** (1994). Biomarkers of stress in urban rivers mixed-function oxygenase and acetylcholinesterase effects in brown trout in rivers in St. John's, Newfoundland. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1947, 1-23.

**Payne, J.E., Mathieu, A., Melvin, W., y Fancey, L.L.** (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32:2, 225-230.

**Peakall, D.** (1992). *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman and Hall Ecotoxicology Series. 291pp.

**Reddy S. M. y Rao, R. K. V.** (1988). *In vivo* recovery of acetylcholinesterase activity from phosphamidon and methylparathion induced inhibition in the nervous tissue of Penaeid prawn (*Metapenaeus monoceros*). *Environmental Contamination and Toxicology Bulletin*. 40: 752-758

**Reddy S. M. y Rao, R. K. V.** (1990) Methylparathion-induced alterations in the acetylcholinesterase and phosphatases in a Penaeid prawn *Metapenaeus monoceros*. *Environment Contamination and Toxicology*. 45: 350-357

**Readman, J. W., Kwong, L. L., Mee, L. D., Bartocci, J. Nilve, G., Rodríguez-Solano, J. A. y Gonzalez-Farias, F.** (1992) Persistent organophosphorus pesticides in tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin*. 24 :8 398 – 402.

**Ribeiro, S., Guilhermino, L., Sousa, J. P. y Soares, A. M. V. M.** (1999) Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **44** ; 287 – 293

**Rodríguez-Fuentes, G. y Gold-Bouchot, G.** (2000). Environment monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research* **50**, 357-360

**Rompas, M. R., Kobayashi, K., Oshima, N. I., Yamato, K. y Mitsuyasu, Y.** (1989) Relationship between toxicity and acetylcholinesterase inhibition of some thiono – and oxon- form organophosphates in tiger shrimp larvae at different stages. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **55** (4): 669 – 673

**Ruiz, D. M.** (1985) El ciclo biológico de los camarones penidos. *Técnica Pesquera*, mayo 12 – 19

**RTECS.** (1990) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. National Institute for occupational safety and health, Hamilton Ontario. [http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extornet/haloxifop\\_methylparathion/methamidophos\\_ext.html](http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extornet/haloxifop_methylparathion/methamidophos_ext.html).

**Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M. D. y Andreu-Moliner, E.** (2000). Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **46**: 57-63.

**Sailatha, D., Shaib, I. y Rao, K.** (1981). Toxicity of chemical and commercial grade malathion of de fish *Tilapia mossambica* . *Proc Indian Academic Scientific*. **90**: 87-92

**Shannon, A., Fulton, M., y Key P,** (2000). The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. *Aquatic Toxicology*. **48**: 127-134

**Scaps, P., Demuynck, S., Descamps, M. y Dhainaut, A. (1997).** Effects of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities of the polychaete *Nereis diversicolor*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* **33**: 203-208

**Scaps, P. Y Borot, O. (2000).** Acetylcholinesterase activity of the polychaete *Nereis diversicolor*: effects of temperature and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **125**, 377-383

**Scott, G.L., Baughman, D.S., Trim, A.H., Dee, J.C. (1987)** Lethal and sublethal effects of insecticides commonly found in nonpoint source agricultural runoff to estuarine fish and shellfish. En W.B. Vemberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg, F.J. Vemberg, eds., *Pollution Physiology of Estuarine Organisms*. University of South Carolina Press, Columbia, SC. pp 251-273

**Spassova, D., White, T., Singh, A. (2000)** Acute effects of acephate and methamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte C* **126**: 79 - 89

**Srinivasulu, R. y Ramana, K.V. (1988).** In vivo recovery of acetylcholinesterase activity from phosphamidon and methylparathion induced inhibition in the nervous tissue of penaeid prawn (*Metapenaeus monoceros*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **40**: 5 , 752-758.

**Sussman, L., Harel, M., Oefner, F., Golman, A., Toker, L. y Silman, I. (1991).** Atomic structure of acetylcholinesterase from torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**: 872 – 878.

**Shugart, L., McCarthy, J., Halbrook, R. (1992).** Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis*, vol. 12, No. 3, 353-360



**Stien, X.; Percic, P.; Gnassia-Barelli, M.; Roméo, M. y Lafaurie, M.** (1998). Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*. **99**: 339 – 345

**Stryer, L.** (1988). *Bioquímica* tercera edición. Ed. Reverté s.a. Tomo I. pp 549

**Tagatz, M. E., Gregory, N. R., Plaia, G. R.** (1982). En *Effects of pesticides on estuarine softbottom ecosystems*. Forbes V. 1996. Working report No. 22. Ministry of Environment and Energy, Denmark. 61 p.

**Takahashi et al.**, (1983, 1987). En Barahona, M. y Sanchez-Fortun, S. (1999). Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and effect of atropine, BW284c5, iso-OMPA y 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution*. **104**: 469-476

**Trecece, G. D.** (1985). Larval rearing technology, sect. III. Texas shrimp farming Manual. Texas agricultural extension service. pp 53-64

**Thomas, (1990)** en Espina y vanegas. *Ecotoxicología y contaminación*, p. 69-106. En : A. V. Botello, J. L. Rojas Galaviz, J. A. Benítez y D. Zárate Lomeli (Eds). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias. EPOMEX. 1996. Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México. 666 p.

**Tusarová, I., Halánek, E. y Koblíha, Z.** (1999). Study on reactivation of enzyme-inhibitor complexes by oximes using acetylcholine esterase inhibited by organophosphate chemical warfare agents. *Enzyme and Microbial Technology* **25** : 400 – 403

**The Royal Society Chemistry.** (1983). *Agrochemicals handbook*. Nottingham, England. 423 p.

**Vale, J. A.** (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*. **102-103**: 649-652

**Volle, R.** (1971) Cholinomimetic drugs. En: Drill's Pharmacology in Medicine, J.R. Dipalma, ed. (New York: McGraw-Hill Book Company). pp 584-607

**Waldichuck, M.** (1985). Methods for measuring the effects of chemical on aquatic animal as indicators of ecological damage. En: Methods for estimating risk of chemical injury: human and no-human biota and ecosystems. Ed. by V.B. Vouk, G.C. Butler, D.G. Hoel and D.B. Peakali. p 493-610

**Walker, C. H., Thompson, H. M.** (1991). Phylogenetic distribution of Cholinesterases and related esterases. En: Mineau Cholinesterases-Inhibiting Insecticides. Vol. 2 , pp 2 - 17

**Walker, C. H.** (1998). The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **40** : 65 – 70.

**World Health Organization.** WHO (1978). Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Part 1. pp 272

**World Health Organization.** WHO (1986). Organophosphorus Insecticides: a General Introduction. *Environmental Health Criteria* 63. pp 181

**Yei-Shung, W., Kuo-Hsiung, L. y Jul-Hung, Y.** (2000) Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**: 79-86.

**Xu, G. Y Bull, D.** (1994). Acetylcholinesterase from the horn fly (Diptera: Muscidae). 11: Biochemical and molecular properties. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **27**: 109-12

## ANEXO I

### MUESTREOS DE CAMPO

#### **Zona de estudio**

La Bahía de Navachiste, Sinaloa fue considerada como zona de estudio, por ser un sistema estuarino poco estudiado, y porque cuenta con áreas agrícolas circundantes muy importantes dentro del Estado de Sinaloa. Dicha bahía representa la zona de movimiento final de una gran cantidad de residuos de agroquímicos, lo cual puede ocasionar efectos secundarios no deseados en organismos de gran importancia ecológica y comercial.

La Bahía de Navachiste se localiza en la costa de Sinaloa, entre los 25°22' y 25° 35' de latitud norte y los 108° 42' y 108°56' de longitud oeste (Contreras, 1984). Se encuentra semicerrada por la Isla de San Ignacio; al oeste se comunica con la Bahía de San Ignacio y al este con el Golfo de California y la Bahía de Macapule; se forman dos canales en este sector por la presencia de una isla de arena.

El clima es de tipo BW (h') hw (e) y la región hidrológica es la 10, la Bahía de Navachiste comprende un área aproximada de 21,400 ha, y representa el 38.82% de la superficie municipal, mientras que el municipio de Guasave se localiza al Noreste de la bahía y representa el 6.0% de la superficie del Estado (INEGI, 1994).

Dentro de los municipios más importantes en cuanto a la superficie agrícola en el año 1991, se encuentran Guasave con 162,233 ha, Ahome con 137,943 ha después le sigue El Fuerte, Salvador Alvarado, Mocorito y Angostura. Que suman en conjunto una superficie agrícola de 268,260 ha (INEGI, 1998). Estos municipios circundantes a la Bahía de Navachiste potencialmente aportan una gran cantidad

de agroquímicos provenientes de los campos a la bahía, lo que se puede decir que estos municipios pueden ser considerados como posibles zonas contaminadoras del área de estudio.

La selección de las estaciones de muestreo se realizó en base a información obtenida de lugares asociados a desembocaduras de ríos, drenajes de áreas urbanas, drenes de campos agrícolas, efluentes de granjas de organismos acuícolas etc. Las estaciones fueron: Cerro Cabezón, Huitusi, Ajero, San Lucas y el Tortugo (Figura 24).

### **Toma de muestras**

Se realizaron dos muestreos de organismos en diciembre de 1999 y abril del 2000. La colecta de organismos se realizó con la ayuda de una red de arrastre. El arrastre no fue mayor a 10 minutos en cada una de las estaciones. Se colectaron más de 10 organismos por especie. Dentro de los organismos colectados está el camarón blanco (*L. vannamei*), camarón azul (*L. stylirostris*), y peces de la familia Gerreidae como *Eucinostomus dowii* (mojarra cantileña), *Diapterus peruvianus* (mojarra de aletas amarillas) ambas especies de hábitos alimenticios preferentemente carnívoros predando sobre pequeños peces, anélidos, crustáceos, moluscos y eventualmente vegetales y detritus, familia Engraulidae como (*Anchoa sp*), que son peces planctofagos ya que extraen los microorganismos por filtración del agua con sus numerosas branquioespinas, familia Ariidae (*chihuil sp*) que son carnívoros depredadores de pequeños crustáceos, peces y huevesillos de estas y otras especies y por ultimo peces de la familia soleidae (*Achirus mazatlanus*), preferentemente carnívoros pero incorporando además detritus en su alimentación.

Estos organismos colectados representan varios tipos de hábitos alimenticios así como también diferentes niveles en la cadena trófica, ya que se obtuvieron organismos bentónicos menores como los crustáceos (camarón blanco y camarón azul) y lenguados los cuales están íntimamente ligados al sedimento, demersales como el chihuil, y organismos filtradores como la anchoveta y la mojarra que es carnívora y que esta asociado a la columna de agua.

Los organismos colectados fueron inmediatamente congelados en hielo seco ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y se analizaron en laboratorio en un tiempo no mayor de tres días. En laboratorio se analizó la actividad de AChE presente en tejido de camarones y peces. Para los crustáceos, el análisis se realizó como en los experimentos de laboratorio mencionados anteriormente. Para el análisis de los peces, se utilizó una dilución de 1:29 en el homogeneizado, ya que los peces presentan una mayor cantidad de proteína en el homogeneizado que los crustáceos. La dilución utilizada en la determinación de proteína fue de 1:49 de solución tampón).

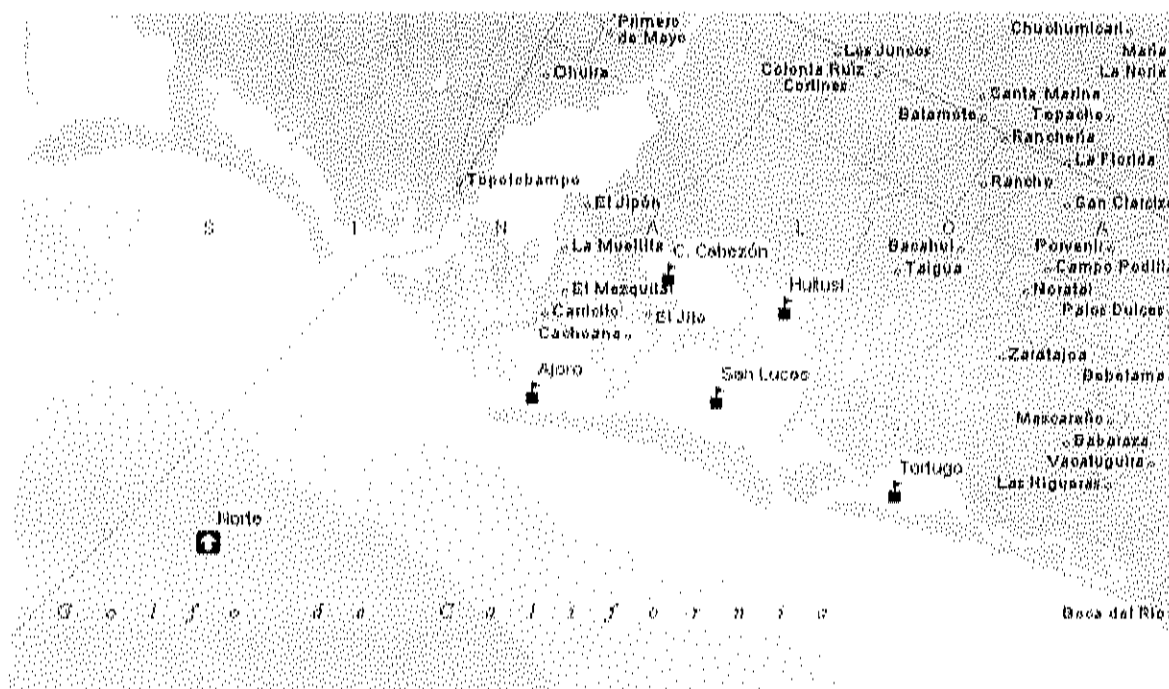


Figura 24. Estaciones de colecta de organismos en el sistema Lagunar de Navachiste, Sinaloa

### Primer muestreo

En este primer muestreo se colectaron organismos en diferentes estaciones cuando el número de especies capturadas era mayor de 10. Los organismos colectados, correspondieron a dos especies de crustáceos: camarón azul y camarón blanco (*L. styllrostris* y *L. vannamei*), y una especie de pez: mojarra plateada (*Eucinostomus dowi*). Las estaciones de colecta se pueden observar en la Figura 4. La actividad de AChE en músculo presente en estas especies se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad de AChE en músculo de organismos colectados en el sistema lagunar de Navachiste. nd= no se colectaron organismos en estas estaciones. Los valores son los promedios de un cuatriplicado de 10 muestras por zona de colecta, con su respectivo valor de error estándar (ES). Las unidades se expresan en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

Estaciones de colecta	<i>L. vannamei</i>	<i>L. stylirostris</i>	<i>Eucinostomus dowi</i>
De mar	$3.68 \pm 0.12$	$2.84 \pm 0.18$	nd
Tortugo	$6.75 \pm 1.53$	nd	$234.83 \pm 4.82$
Cerro cabezón	$5.60 \pm 1.29$	$4.45 \pm 1.38$	$199.77 \pm 24.44$
Huitusi	$2.97 \pm 0.56$	$5.37 \pm 1.17$	nd
Ajoro	nd	nd	$59.63 \pm 13.9$
San Lucas	nd	nd	$328.71 \pm 43.95$

El camarón de mar, fue colectado cerca de las bocas de la zona estuarina, esto fue hecho con la finalidad de tomar a estos organismos como control o zona no contaminada. Los demás organismos se colectaron dentro del área estuarina.

Los valores promedios de actividad de AChE en músculo de camarón azul, resultaron ser más altos en los organismos de la zona del Huitusi ( $5.37 \pm 1.17 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína), mientras que el valor más bajo fue en organismos colectados en mar abierto ( $2.84 \pm 0.18 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína). De acuerdo a los resultados obtenidos en estas tres estaciones, se observa un traslape en la actividad de AChE presente en organismos colectados en el Huitusi y los del Cerro Cabezón. La actividad de AChE fue menor en organismos colectados en la boca del sistema lagunar de Navachiste, Sinaloa. Esta tendencia se observa en la Figura 25.

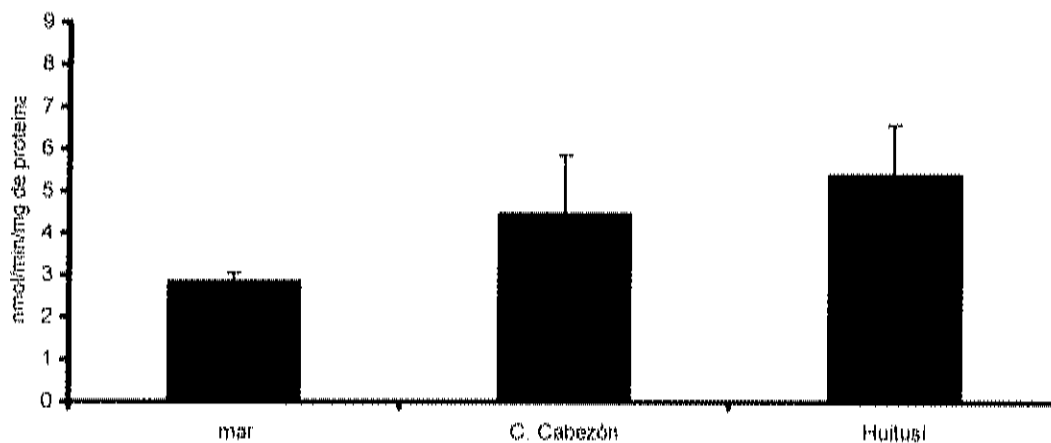


Figura 25. Actividad de AChE en músculo de camarón azul colectado en tres estaciones de la Bahía de Navachiste. Los valores son promedio 10 organismos, para cada organismo, el análisis fue hecho por cuatriplicado, con sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad está expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

En lo que respecta al camarón blanco, el valor promedio de actividad más baja fue en la zona del Huitusi con un  $2.97 \pm 0.56 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína, mientras que el mayor valor de actividad se presentó dentro de la zona del Tortugo ( $6.75 \pm 1.53$ ). Las diferencias en cuanto a la actividad de AChE en camarón blanco colectados en las estaciones de muestreo, las podremos ver gráficamente en la Figura 26. La cual muestra un traslape entre la actividad de AChE presente en organismos colectados del Tortugo y el Cerro Cabezón, lo cual se podría decir que éstas dos estaciones representan zonas de poca contaminación.

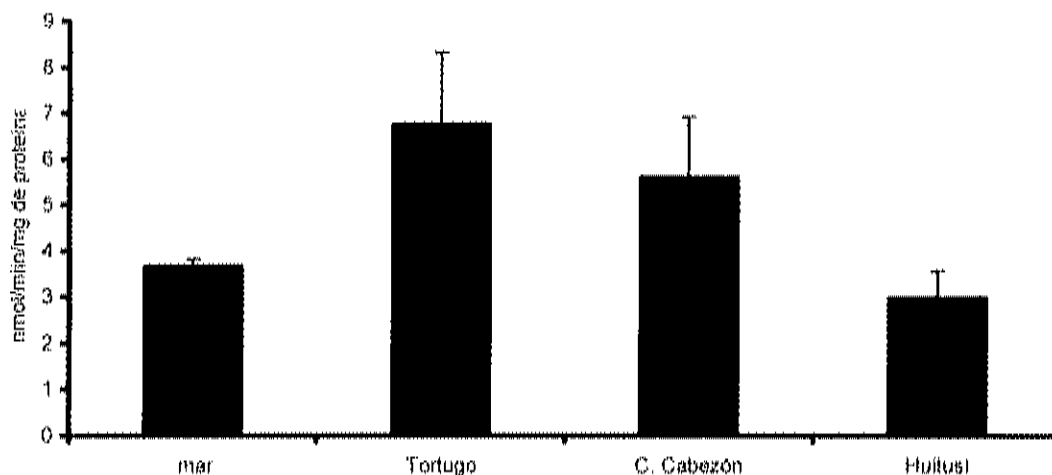


Figura 26. Actividad de AChE en músculo de camarón blanco colectado en cuatro estaciones. Los valores son promedio 10 organismos, para cada organismo el análisis fue hecho por cuatuplicado, con sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad está expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

Por otro lado, los valores de actividad enzimática fueron mayores en las especies de peces que las actividades determinadas en los crustáceos, esto es debido principalmente a la diferencia de tamaño y la cantidad de proteína presente en los peces colectados. En peces, la cantidad de actividad de AChE en músculo varía de especie a especie.

Los valores de la actividad de AChE encontrados en peces colectados en campo (*Eucinostomus dowi*), se muestran en la Figura 27. La actividad de AChE presente en peces colectados en la estación de Ajoro muestran una menor actividad de AChE ( $59.63 \pm 13.90 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína), comparadas con las estaciones del Tortugo, San Lucas y el Cerro Cabezón. La mayor actividad enzimática fue de  $328.71 \pm 43.95 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína, y correspondió a peces colectados en la estación del Cerro Cabezón.



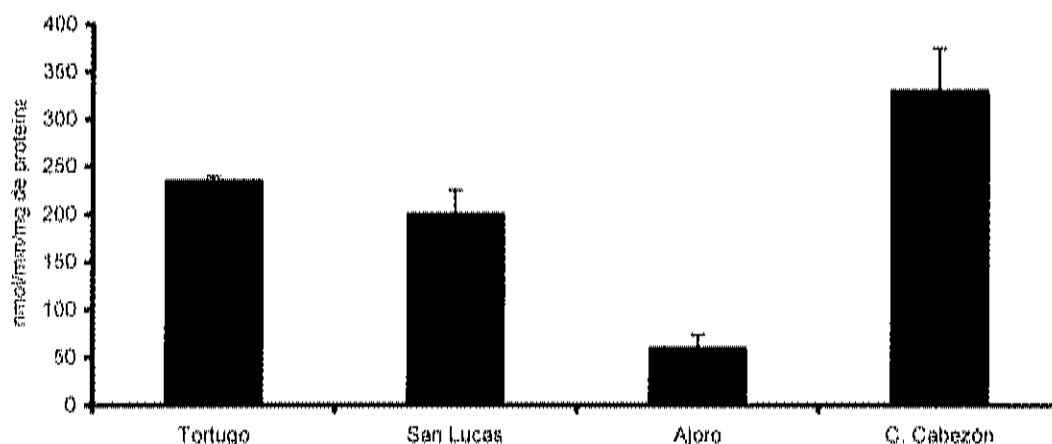


Figura 27. Actividad de AChE presente en músculo de mojarra de aletas amarillas en diferentes estaciones de muestreo. Los valores son promedio 10 organismos, para cada organismo el análisis fue hecho por cuatuplicado, con sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad está expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

## Segundo muestreo

En el segundo muestreo, sólo se colectaron organismos de dos estaciones (Huitusi y Cerro cabezón). Dentro de los organismos acuáticos colectados se encuentran los crustáceos (*L. vannamei*), peces como mojarra (*Diapterus peruvianus*), chihuil de la familia Ariidae, anchovetas de la familia Engraulidae y lenguados de la familia soleidae.

La actividad determinada en crustáceos fue de aproximadamente 25 veces menor que la obtenida en peces. La mayor actividad de AChE estuvo presente en organismos de la familia Ariidae (chihuil), seguido por especies de la familia Engraulidae (anchoveta) y Gerreidae (mojarra), la menor actividad de AChE se encontró en peces de la familia soleidae (lenguado) como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Actividad de AChE encontrada en músculo de diferentes organismos colectados en el sistema Lagunar de Navachiste Sinaloa. nd = no se colectó organismos en esta estación. Los valores representan el promedio de 10 organismos con su valor de error estándar. La actividad esta expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

Organismos	Huitusi	Cerro Cabezón
Camarón blanco	$4.34 \pm 0.54$	$3.23 \pm 1.09$
Mojarra	$47.61 \pm 2.7$	$62.28 \pm 4.41$
Chihuil	$100.71 \pm 12.93$	$107.79 \pm 15.26$
Anchoveta	$80.19 \pm 6.62$	nd
Lenguado	nd	$14.00 \pm 3.35$

La actividad de AChE en camarón blanco del primer muestro fue menor en la zona del Huitusi, respecto al segundo muestreo en la misma zona, mientras que la actividad de AChE de camarón blanco de la zona del Cerro Cabezón en el segundo muestreo fue menor comparado con el valor obtenido en el primer muestreo. La Figura 28, muestra la actividad de AChE determinada en camarón blanco durante el segundo muestreo.

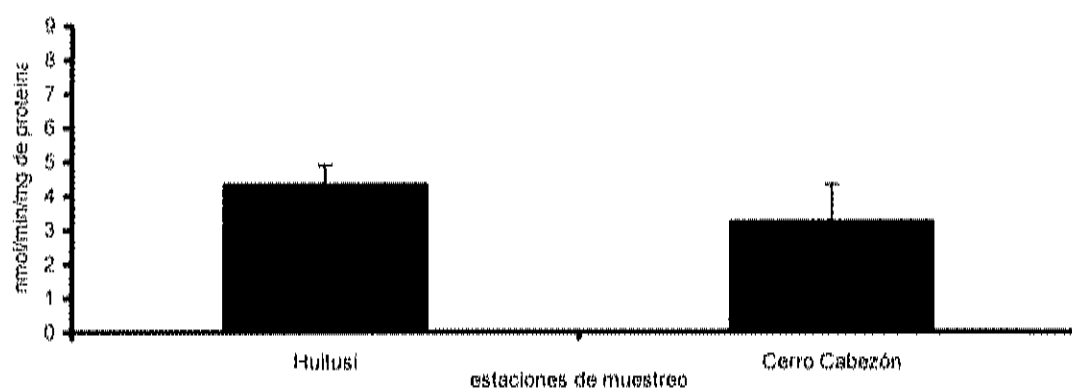


Figura 28. Actividad de AChE en músculo de camarón blanco de dos estaciones de muestreo. Los valores son promedio 10 organismos, para cada organismo el análisis fue hecho por cuatuplicado, con sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad está expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína

Respecto a las actividades de AChE encontradas en los peces de cada estación, no difieren en gran medida uno del otro, lo que sí difiere en gran medida, es la actividad encontrada en cada especie, la cual es evidente en estos datos que la actividad de AChE difiere de una especie a otra

Las siguientes figuras (29 y 30), muestran las actividades de acetilcolinesterasa encontradas en especies acuáticas del Huitusi y el Cerro Cabezón. Estas dos estaciones son importantes, ya que, representan zonas urbanas y además presentan desembocaduras de drenes agrícolas, lo cual pudiera representar zonas de influencia de contaminación del sistema lagunar Navachiste.

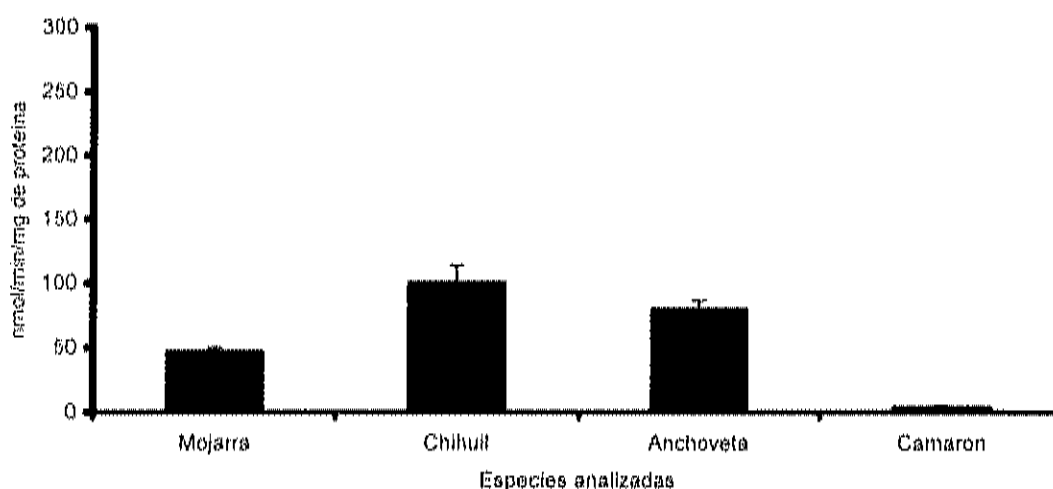


Figura 29. Actividad de AChE en músculo de organismos colectados en la estación del Huitusi. Los valores son promedio 10 organismos, para cada organismo el análisis fue hecho por cuatuplicado, con sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad está expresada en  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Las actividades de acetilcolinesterasa encontradas en organismos colectados en cada una de las zonas de muestreo, no difieren en gran medida, aunque se observa que la actividad encontrada en camarón de la zona del Cerro Cabezón fue menor a la del camarón colectado en el Huitusi.

Respecto a la actividad de AChE en lenguados, no se puede comparar ya que no se colectó este organismo en la zona del Huitusi, pero haciendo una comparación con los organismos que sí se encontraron en ambas zonas, se observó que la actividad de acetilcolinesterasa presente en la mojarra del Cerro Cabezón reflejo ser ligeramente mayor que la del Huitusi. En el caso de la actividad enzimática presente en el chiguil, colectado en ambas estaciones no se observó gran variabilidad en dicha actividad.

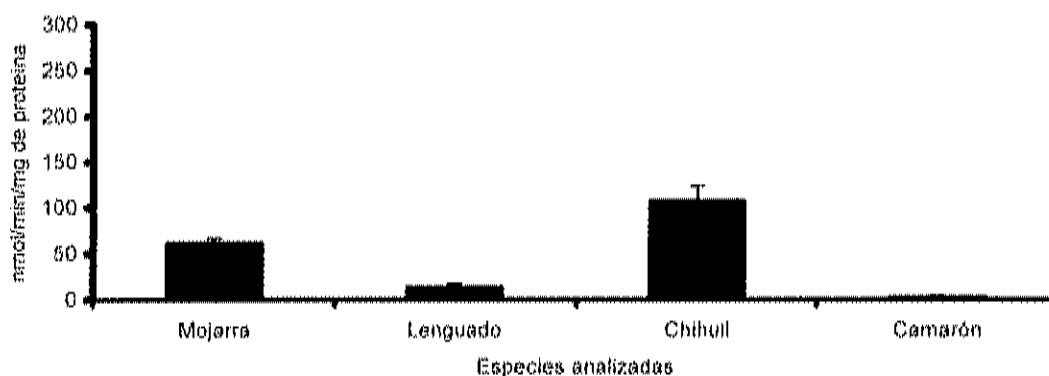


Figura 30. Actividad de AChE en músculo de organismos colectados en la estación del Cerro Cabezón. Los valores son promedio 10 organismos, para cada organismo se analizo por cuatriplicado, además sus respectivos valores de error estándar (ES). La actividad está expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

Respecto a los valores promedios de actividad de AChE en músculo de camarón blanco colectados en campo en dos estaciones (Huitusi y Cerro Cabezón), no fueron diferentemente grandes, lo cual pudiera considerarse que no refleja un efecto de contaminación en ninguna de las estaciones estudiadas. El traslape generado en los dos valores promedios de AChE, origina la conclusión hipotética de la no presencia de contaminación en esas dos zonas del primer muestreo.

A pesar de que las actividades enzimáticas encontradas en organismos colectados en campo durante el primer muestreo; como el camarón azul de mar 2.79, camarón blanco del Huitusi 2.85 y para el pez de la zona de Ajoro 59.63  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína, si puede reflejar un posible efecto de estrés en la

actividad enzimática de dichos organismos, a pesar de esto, no se puede concluir que esta baja actividad sea ocasionada por la presencia de plaguicidas organofosforados (OF), ya que para asegurar contundentemente la presencia de estos plaguicidas dentro del ambiente acuático es necesario conocer cuales son los productos químicos que se aplican y en que cantidad, así como también los periodos en que se aplican, esto es con el fin de establecer mejor las fechas de muestreo y poder llegar a concluir que los organismos estuvieron bajo estrés, ocasionado por residuos de OF.

Los resultados obtenidos en campo, no reflejan un dato comparativo con las distintas zonas de muestreo, ya que por un lado no difieren mucho y por otro lado, no se tuvieron organismos de una estación control para una mejor comparación. Sin embargo las actividades de AChE encontradas en organismos de diferentes estaciones, muestran diferencias de actividad enzimática en los dos periodos de muestreo, lo cual pudiera reflejar una posible presencia de OF, ya que las fechas de muestreo coinciden con el periodo en el que ya se aplicaron productos químicos en los cultivos y que corresponde al ciclo Otoño-Invierno.

El estudio preliminar de campo no demuestra claramente el efecto de plaguicidas organofosforados sobre la actividad de AChE, ya que fue difícil encontrar organismos de una estación que se considerara como referencia. Por lo que sólo se puede concluir que los promedios de actividad de AChE presentes en camarón blanco, fueron diferentes entre especies, tanto en las estaciones de muestreo como también en los dos periodos de muestreos.

## ANEXO II

Valores de actividad y porcentajes de inhibición de la actividad de AChE de camarón blanco, en cada uno de los experimentos realizados.

Actividad de colinesterasa en músculo de camarón con tres diferentes sustratos; acetiltiocolina (ATC), propioniltiocolina (PTC) y butiriltiocolina (BTC). Los valores representan un promedio con sus respectivos valores de error estándar (ES). Las unidades son expresadas en  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Conc. mM	ATC	PTC	BTC
0.001	0.368 ± 0.070	0.516 ± 0.056	0.628 ± 0.042
0.1	0.377 ± 0.062	0.530 ± 0.034	0.724 ± 0.061
1	0.473 ± 0.034	0.666 ± 0.004	0.666 ± 0.030
5	1.024 ± 0.063	1.014 ± 0.004	0.727 ± 0.026
25	1.772 ± 0.205	1.808 ± 0.044	0.840 ± 0.013
50	2.757 ± 0.083	2.296 ± 0.025	0.843 ± 0.025
125	4.188 ± 0.040	3.561 ± 0.016	0.915 ± 0.032
250	4.396 ± 0.113	4.318 ± 0.053	1.132 ± 0.049
500	4.826 ± 0.094	4.747 ± 0.076	1.439 ± 0.066

Actividad de colinesterasa en ojo de camarón con tres diferentes sustratos; acetiltiocolina (ATC), propioniltiocolina (PTC) y butiriltiocolina (BTC). Los valores representan el promedio de cuatro réplicas por muestra y un triplicado por sustrato analizado, con su respectivo error estándar. ). Las unidades son expresadas en  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Conc. mM	ATC	PTC	BTC
0.001	0.354 ± 0.192	0.163 ± 0.034	0.209 ± 0.042
0.1	0.243 ± 0.050	0.148 ± 0.042	0.171 ± 0.018
1	0.797 ± 0.060	0.362 ± 0.028	0.212 ± 0.029
5	3.387 ± 0.150	2.147 ± 0.118	0.262 ± 0.028
25	14.229 ± 0.269	6.234 ± 0.166	0.520 ± 0.019
50	20.599 ± 0.930	13.053 ± 0.110	0.666 ± 0.038
125	28.039 ± 0.881	17.706 ± 0.195	0.937 ± 0.063
250	34.796 ± 1.280	21.159 ± 0.181	1.228 ± 0.061
500	35.368 ± 1.580	27.883 ± 0.072	1.377 ± 0.016

Porcentajes de inhibición de la actividad de AChE en músculo y ojo utilizando tres inhibidores.

Inhibidor (ESE y BW) ISO_OMPA	0.00625mM 0.5 mM	0.0125mM 1.0 mM	0.025mM 2.0 mM	0.05mM 4.0 mM	0.1mM 8.0 mM
<b>Músculo</b>					
ESERINA	74%	76%	81%	84%	83%
BW284c51	55%	69%	74%	74%	72%
iso-OMPA	0%	0%	0%	0%	7%
<b>Ojo</b>					
ESERINA	93%	95%	96%	97%	98%
BW284C51	77%	90%	94%	94%	98%
iso-OMPA	57%	51%	66%	59%	53%

Porcentajes de inhibición de la actividad de AChE *in vitro* utilizando diferentes concentraciones de insecticidas organofosforados.

Malatión mg ml <sup>-1</sup>	0.00024	0.00048	0.00096	0.00192	0.00384
músculo	17%	23%	40%	63%	82%
ojo	47%	57%	68%	85%	92%
Metamidofos mg ml <sup>-1</sup>	0.000282	0.00056	0.00113	0.0022	0.0045
músculo	4%	2%	14%	33%	91%
ojo	7%	9%	24%	51%	61%
Diazinón mg ml <sup>-1</sup>	0.000359	0.000718	0.00143	0.00287	0.0057
músculo	2%	16%	11%	13%	23%
ojo	43%	23%	24%	21%	43%

Actividad de AChE y porcentaje de inhibición en músculo expuesto a metamidofos (estándar, técnico y comercial). Los valores son promedio de un cuatuplicado por muestra y un triplicado por cada presentación de metamidofos además sus respectivos valores de error estándar (ES). El porcentaje se determinó tomando el valor de actividad del blanco con acetato (ConA). La actividad esta expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína

Conc. $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Estándar Actividad	%Inh.	Técnico Actividad	%Inh	Comercial Actividad	%Inh
SinA	16.39 $\pm$ 0.69		10.57 $\pm$ 0.18		9.64 $\pm$ 0.15	
ConA	14.90 $\pm$ 0.07		14.52 $\pm$ 0.21		9.34 $\pm$ 0.12	
2.82x10 <sup>-4</sup>	14.32 $\pm$ 0.46	4	3.88 $\pm$ 0.09	73	2.95 $\pm$ 0.26	68
5.6x10 <sup>-4</sup>	14.54 $\pm$ 0.36	2	2.92 $\pm$ 0.21	80	2.79 $\pm$ 0.20	70
1.13x10 <sup>-3</sup>	12.78 $\pm$ 0.81	14	3.07 $\pm$ 0.24	79	2.76 $\pm$ 0.18	70
2.2x10 <sup>-3</sup>	9.93 $\pm$ 0.66	33	4.52 $\pm$ 0.47	69	2.48 $\pm$ 0.05	73
4.5x10 <sup>-3</sup>	7.37 $\pm$ 0.54	50	5.95 $\pm$ 0.05	59	3.20 $\pm$ 0.10	66

Actividad de AChE y porcentaje de inhibición en ojo expuesto a metamidofos (estándar, técnico y comercial). Los valores son promedio de un cuatuplicado por muestra y un triplicado por cada presentación de metamidofos además sus respectivos valores de (ES). El porcentaje se determinó tomando el valor de actividad del blanco con acetato (ConA). La actividad esta expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

Conc. $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Estándar Actividad	%Inh.	Técnico Actividad	%Inh	Comercial Actividad	%Inh
SinA	782.5 $\pm$ 9.1		795.4 $\pm$ 10.6		665.4 $\pm$ 5.74	
ConA	492.9 $\pm$ 14.3		613.0 $\pm$ 2.45		324.6 $\pm$ 6.0	
2.82x10 <sup>-4</sup>	458.6 $\pm$ 10.5	41	10.77 $\pm$ 0.45	98	10.21 $\pm$ 0.57	97
5.6x10 <sup>-4</sup>	446.9 $\pm$ 11.2	43	11.77 $\pm$ 0.45	98	7.39 $\pm$ 0.48	98
1.13x10 <sup>-3</sup>	376.9 $\pm$ 11.6	52	17.82 $\pm$ 0.81	97	5.77 $\pm$ 0.31	98
2.2x10 <sup>-3</sup>	242.1 $\pm$ 14.0	69	25.89 $\pm$ 1.7	96	18.70 $\pm$ 1.88	94
4.5x10 <sup>-3</sup>	191.3 $\pm$ 17.7	76	44.70 $\pm$ 0.83	93	13.77 $\pm$ 1.32	96



Porcentaje de inhibición de AChE en camarón expuesto a concentraciones subletales de metamidofos. Los porcentajes fueron calculados a partir del control en cada tiempo analizado. (nc) los datos de actividad en este tiempo no fueron calculados por presentar una actividad mayor en las concentraciones ensayadas que en el control.

Conc mg l <sup>-1</sup>	% de inhibición							
	ojo				músculo			
	6h	24h	48h	96h	6h	24h	48h	96h
0.125	1	nc	6	39	21	7	6	19
0.296	29	nc	0	12	27	1	4	23
0.526	22	nc	14	21	28	0	8	22

Actividad de AChE presente en camarón en el período de recuperación. Los valores son los promedios de un cuatrimplicado de seis muestras por concentración y de cada tiempo de recuperación. La actividad de AChE se expresa en nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> de proteína. Cada valor viene acompañado de su error estándar (ES).

Tejido	Conc.	Tiempo de recuperación (horas)				
		6	24	48	96	240
Músculo	0.0	4.06 ± 0.23	3.35 ± 0.23	3.55 ± 0.43	3.58 ± 0.37	3.26 ± 0.33
	0.125 mg l <sup>-1</sup>	4.10 ± 0.32	3.04 ± 0.15	2.51 ± 0.17	3.16 ± 0.26	3.16 ± 0.15
	0.296 mg l <sup>-1</sup>	2.93 ± 0.07	2.52 ± 0.16	1.86 ± 0.24	2.57 ± 0.14	2.62 ± 0.12
	0.526 mg l <sup>-1</sup>	2.31 ± 0.23	1.88 ± 0.17	1.65 ± 0.13	2.22 ± 0.16	1.84 ± 0.26
Ojo	0.0	30.11 ± 1.55	18.13 ± 0.78	19.92 ± 1.20	23.06 ± 0.51	28.46 ± 1.54
	0.125 mg l <sup>-1</sup>	29.56 ± 0.41	19.55 ± 0.46	22.97 ± 0.78	20.03 ± 1.24	25.92 ± 2.01
	0.296 mg l <sup>-1</sup>	19.61 ± 0.69	15.05 ± 1.13	20.85 ± 0.21	15.20 ± 0.42	26.12 ± 0.86
	0.526 mg l <sup>-1</sup>	17.85 ± 2.64	16.94 ± 0.86	15.57 ± 0.60	18.20 ± 0.89	16.75 ± 0.50



