

ECOTOXICIDAD ACUÁTICA DE DOS COLORANTES Y DE TRES ANTIPARASITARIOS DE IMPORTANCIA EN ACUICULTURA EN *Daphnia magna*

AQUATIC ECOTOXICITY OF TWO DYES AND THREE ANTIPARASITICS OF IMPORTANCE IN AQUACULTURE ON EMPLOYING *Daphnia magna*

José Iannacone^{1,2} y Lorena Alvariano²

Resumen

La presencia y la evaluación ecotoxicológica de productos farmacéuticos en el ambiente acuático es un área de investigación emergente a nivel global. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto toxicológico acuático de dos colorantes de importancia en la acuicultura, el azul de metileno y el verde de malaquita, y de tres antiparasitarios antihelmínticos, dos productos naturales Parasin®, leche de oje® y el químico sintético albendazol-praziquantel sobre *Daphnia magna* Strauss 1820 (Crustácea: Daphniidae). En *D. magna* (CL₅₀ a 96 h de exposición), los mayores efectos se encontraron con el azul de metileno (CL₅₀= 0.38 mg·L⁻¹) en comparación al verde de malaquita (CL₅₀= 2.97 mg·L⁻¹). Con relación a los productos antiparasitarios en *D. magna* (CL₅₀ a 48 h), los mayores efectos se encontraron con la leche de oje (CL₅₀= 0.07 %) en comparación al Parasin (CL₅₀= 0.99 %). Se observó que el praziquantel (CL₅₀= 30.07 mg·L⁻¹) y el albendazol (CL₅₀= 180.4 mg·L⁻¹) produjeron efectos sobre *D. magna* a 48 h de exposición. Los dos colorantes produjeron altos efectos en términos de CL₅₀ sobre *D. magna* en relación a las concentraciones requeridas para su uso en acuicultura. Los dos productos naturales antiparasitarios ocasionaron riesgos en el ambiente acuático a concentraciones menores al 1%. La técnica del cociente de riesgo indicó que el praziquantel y el albendazol no ocasionaron riesgo al ambiente acuático.

Palabras claves: albendazol, azul de metileno, ecotoxicología, praziquantel, pulga de agua, verde de malaquita

Abstract

Ecotoxicological assessment of pharmaceutical products in aquatic environments is an area of emerging research at global level. The aims of the current research were to evaluate aquatic toxicological effects of two aquaculture important dyes: methylene blue and malachite green, of three anthelmintic antiparasitic products, of two natural products Parasin® and leche de oje®, and of the synthetic chemical albendazole-praziquantel on *Daphnia magna* Strauss 1820 (Crustacea: Daphniidae). On *D. magna* (LC₅₀ at 96 h exposure), the highest effects were found with methylene blue (LC₅₀= 0.38 mg·L⁻¹) in comparison to malachite green (LC₅₀= 2.97 mg·L⁻¹). In relation to antiparasitic products on *D. magna* (LC₅₀ at 48 h), the highest effects were found with leche de oje (LC₅₀= 0.07 %) in comparison to Parasin (LC₅₀= 0.99 %). Praziquantel (LC₅₀= 30.07 mg·L⁻¹) and albendazole (LC₅₀= 180.4 mg·L⁻¹) were observe to produce effects on *D. magna* at 48 h of exposure. Both dyes produced high effects in terms of LC₅₀ on *D. magna* in relation to concentrations required for their use in aquaculture. Both antiparasitic natural products produced risks in aquatic environments at concentrations less than 1%. The quotient risk technique indicated that praziquantel and albendazole did not produce risks on an aquatic environment.

Key words: albendazole, methylene blue, ecotoxicology, praziquantel, water flea, malachite green

Introducción

En la actualidad muchos productos químicos farmacéuticos son producidos y usados en grandes volúmenes a nivel mundial. Por ende, la presencia y la evaluación de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático es un área de investigación emergente a nivel global (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton & Ternes, 1999; Chapman, 2006; Jjemba, 2006). En Europa, aproximadamente 13 500 tn de antibióticos son consumidos por año, de los cuales 65% son usados en medicina humana y 35% en

medicina veterinaria. Una cantidad desconocida de estos componentes son evacuados al ambiente vía las aguas residuales o cuando las heces son usadas con residuos farmacéuticos para la fertilización de tierras agrícolas (Lützhof *et al.*, 1999; Backhaus *et al.*, 2000; Lalumera *et al.*, 2004; Woodward, 2006). Los productos veterinarios y humanos aplicados con propósitos medicinales o como aditivos pueden llegar al ambiente acuático por rutas directas o indirectas (Boxall *et al.*, 2003a b; Boxall & Long, 2005).

Muchos productos antihelmínticos como el praziquantel y el albendazol son usados en grandes cantidades y tienen alta potencialidad de ingresar al ambiente (Oh *et al.*, 2006). Sin embargo, no se encuentran bien caracterizadas las consecuencias ecológicas de su ingreso al ambiente acuático, a pesar de su extremadamente baja constante de Henry, que indica la partición de equilibrio entre el aire y el agua, y su razonable solubilidad en agua que sugieren que estos compuestos pueden causar problemas en la columna de agua (Boxall *et al.*, 2003a).

El praziquantel es una de las drogas más usadas para el tratamiento de schistosomiasis producido por *Schistosoma mansoni* Sambon 1907. El mecanismo exacto de acción del praziquantel no está exactamente entendido en este parásito, pero parece que permite que el parásito sea más susceptible a su eliminación por el sistema inmunológico del hospedero (Karanja *et al.*, 1998). El praziquantel es un tenicida y tiene acción sobre *Dipylidium caninum* (Linnaeus 1758), larvas de *Taenia solium* Linnaeus 1758 y *Taenia pisiformis* Bloch 1780, provocando la pérdida del calcio intracelular y por contracciones masivas, vacuolización y desintegración del helminto (Pareja *et al.*, 2002; Sibat & Ibañez, 2003; Holm-Martin *et al.*, 2005). El praziquantel es un antihelmíntico de amplio rango en mamíferos, incluyendo al ser humano, que modula la permeabilidad de la membrana celular de los céstodos y tremátodos, permitiendo la desintegración del tegumento (Hempel *et al.*, 2006). También, quimioterapias con praziquantel se han usado para el control de monogéneos en peces (Kim *et al.*, 2001).

Belkind-Valdovinos *et al.* (2004) indican que el albendazol es empleado para el control de diversas enteroparasitosis humana causada por nemátodos en áreas endémicas del Perú. El tratamiento con albendazol es también eficiente para el control de nemátodos intestinales de animales domésticos (Leathwick *et al.*, 2006). Alvarez-Sánchez *et al.* (2006) señalan que el albendazol es eficiente para el control de *Fasciola hepatica* Linnaeus 1758 en animales de importancia pecuaria.

En el Perú, existen muchas plantas con propiedades antiparasitarias individuales y en mezclas de importancia etnobotánica que no han sido evaluadas con relación a su impacto en el ambiente acuático (Maguiña & Iannacone, 2000).

El oje (*Ficus insipida* Willd; Moaceae) produce un látex con propiedades antihelmínticas y es aún usado en la medicina tradicional por la gente local e indígena de las regiones amazónicas (Hansson *et al.*, 2005). Varias sustancias están ligadas con su efectividad: ficina, filoxantina, b-amirina, lepeol, lavandulol, phyllantel, eloxantina, filantelol y doxantina. Sin embargo, este vermífugo debido a su alta toxicidad aguda ha producido varios casos de intoxicación por sobredosis en el ser humano (De Amorin *et al.*, 1999).

La semilla del zapallo (*Cucurbita maxima* Dutch; Cucurbitaceae) es usada en el Perú en medicina tradicional ya que presenta propiedades antiparasitarias sobre céstodos (Guarrera, 1999; Díaz *et al.*, 2004) y sobre protozoos causantes de la malaria (Amorim *et al.*, 1991). Se han descrito varias sustancias químicas relacionadas con su efecto antihelmíntico como cucurbitina, peporesina, lecitina, guanosina, titosterina y el ácido cítrico.

Las hojas de la hierba buena (*Mentha spicata* (Briq.) Harley; Labiatae) es una planta aromática y medicinal usada por el hombre moderno (Lagarto *et al.*, 1999). Estudios etnobotánicos informan de su empleo como antiséptico debido a sus aceites esenciales (Imai *et al.*, 2001). Se le usa, además, como tóxico y repelente del vector de malaria *Anopheles stephensi* Liston 1901 (Tripathi *et al.*, 2004). Se ha evaluado su acción antimutagénica (Yu *et al.*, 2004) y sus efectos en la biología reproductiva humana (Akdogan *et al.*, 2007).

Varias medicinas veterinarias pueden ser usadas como antisépticos en la acuicultura, como es el caso del verde de malaquita y del azul de metileno, y por ende muchos organismos acuáticos no destinatarios del control son expuestos a estas sustancias químicas (Wollenberg *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2006; Hernando *et al.*, 2007).

El colorante verde de malaquita es usado globalmente como un antifúngico y un antiparasitario en crustáceos y peces de importancia en acuicultura (Rintamaki *et al.*, 2005; Zilberg & Tamar, 2006). Se le ha empleado para el control del protozoo *Ichthyophthirius multifiliis* Bouquet 1876 (Ichthyoptariasis), y del monogéneo *Dactylogyrus vastator* Nybelin 1924 (Schmahl *et al.*, 1992; Molnar, 1995; Rintamaki *et al.*, 2005). Su uso no está permitido en los Estados Unidos, la Unión Europea y en algunos países del sudeste Asiático como Tailandia, debido a que se considera que tiene un rol altamente tóxico sobre las enzimas respiratorias. En adición, es esencial tener periodos largos de carencia después de la aplicación del verde de malaquita debido a los residuos persistentes en los alimentos de origen acuático (GESAMP, 1997; Grant *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2006). También el verde de malaquita es empleado en salud, en la industria de alimentos y textil; así como para el control de helmintiasis en peces y otros organismos acuáticos (Van de Riet *et al.*, 2005; Hernando *et al.*, 2007). Se le ha reportado que causa variación de los parámetros hematológicos, carcinogénesis, mutagénesis, fracturas cromosómicas, teratogenicidad y toxicidad respiratoria (Silveira *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2004).

El azul de metileno es ocasionalmente usado como antiséptico tipo antifúngico e infecciones por protozoos en cultivo de peces. Puede proveer protección contra la intoxicación por nitrilos (GESAMP, 1997). El azul de metileno es usado como

un fijador y colorante básico para el diagnóstico de protozoos parásitos, células sanguíneas y otras preparaciones microscópicas (Iannacone *et al.*, 1999; Costamagna *et al.*, 2004). Stockert & Herkovits (2003) han evaluado la toxicidad del azul de metileno sobre embriones de *Bufo arenarum* (Hensel 1867). Rifici *et al.* (1996) han determinado la toxicidad sobre el pez *Pimephales promelas* Rafinesque 1820. En Salud Pública al azul de metileno se le usa para el tratamiento de una enfermedad denominada metahemoglobinemia (Clifton & Leikin, 2003; Stocche *et al.*, 2004) y para casos de intoxicación por herbicidas (Watt *et al.*, 2005). También se ha evaluado al carbón activado y a la planta acuática *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid como agentes de remoción del azul de metileno en el agua (Waranusantigui *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

Daphnia magna Strauss 1820 (Crustácea: Daphniidae) es una especie partenogenética usada extensivamente en pruebas de toxicidad para evaluar sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y lixiviados entre otros. Esto es debido a: 1) amplia distribución geográfica, 2) importante papel en la comunidad zooplanctónica, 3) facilidad de cultivo, 4) corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías (Castillo, 2004; Kallqvist *et al.*, 2006; Reynaldi *et al.*, 2006).

Muchos productos farmacéuticos aplicados con propósitos medicinales o como aditivos pueden llegar finalmente al ambiente dulceacuícola por rutas directas o indirectas. Entre dichos compuestos tenemos a productos antihelmínticos como antiparasitarios naturales a base de plantas y a varias medicinas veterinarias que pueden ser usadas como antifúngicos y antiparasitarios en la acuicultura. Sin embargo, no se conocen las consecuencias ecológicas del ingreso de estas sustancias a la columna de agua. Por ende, la evaluación del efecto de estos compuestos en organismos acuáticos no destinatarios, como el cladóceros *D. magna*, a través de una evaluación del riesgo ecológico permitirá tomar las medidas de mitigación necesarias para la protección de los ambientes acuáticos por productos farmacéuticos.

Por ende, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la ecotoxicidad acuática de dos antifúngicos usados en acuicultura y de tres antiparasitarios empleando *D. magna* como un organismo de ensayo.

Materiales y métodos

Los bioensayos ecotoxicológicos acuáticos se realizaron en el Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Santiago de Surco, Lima, Perú.

Productos químicos

Colorantes

Verde de malaquita: (C₄₈H₅₀N₄O₄·2HC₂O₄), CAS = 569-64-2 y una solubilidad en agua de 20 g L⁻¹. Se preparó una solución madre a una concentración de 40 mg L⁻¹. A partir de estas soluciones se realizaron las diluciones respectivas empleando el medio de cultivo artificial de *Daphnia* (Medio ADaM) (Iannacone *et al.*, 2007). Se utilizaron botellas plásticas de un litro para la preparación de cada una de las cinco concentraciones. Para el verde de malaquita se utilizó las siguientes cinco concentraciones en orden creciente: 2,5, 5, 10, 20 y 40 mg L⁻¹.

Azul de metileno: (C₁₆H₁₈C₁N₃S·3H₂O). CAS = 61-73-4 y una solubilidad en agua de 40 g L⁻¹. Se siguió el mismo procedimiento que para el verde de malaquita, pero se preparó la solución madre a 20 mg L⁻¹. Se emplearon las siguientes cinco concentraciones en orden creciente: 0.156, 0.312, 0.625, 1.25 y 2.5 mg L⁻¹.

Antiparasitarios

Parasin®: El producto es elaborado por el laboratorio Bionaturista®. Este producto es un macerado natural. El antiparasitario está compuesto por semillas de zapallo *C. maxima*, semillas de papaya *Carica papaya* L., hierba buena (*M. spicata*), propoleo, ceras, polen y aceites aromáticos, entre otros elementos. Este producto tiene acción antihelmíntica y produce alteraciones en la motilidad del helminto, proteólisis y muerte del mismo, y microscópicamente provoca alteración del tegumento, de la membrana basal, estructuras internas y ruptura de la cáscara de los huevos en los proglótidos maduros y grávidos de los céstodos. El screening fitoquímico fue realizado en el Laboratorio de análisis químico de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). Los procedimientos estándares para la marcha fitoquímica mostraron para saponinas (producción de espuma) = -; taninos (Gelatina/FeCl₃) = +; flavonoides (Shinoda) = -; esteroides (Liebermann B) = -; quinonas (Bornträger) = -; fenoles (Rosenheim) = -; alcaloides (Dragendorff/Mayer) = + y aminoácidos (Ninhidrina) = +. Siendo - = reacción negativa y + = reacción positiva.

Leche de Ojé®: Este antiparasitario es elaborado por el laboratorio Santa Natura®. Este producto es un macerado compuesto por Leche de Ojé *F. insipida*, hierba buena y miel. En su mecanismo de acción disuelve las proteínas de la cutícula que recubre el cuerpo de los parásitos intestinales, permitiendo su mortalidad y digestión por los mecanismos bioquímicos gastrointestinales normales (Giraldo *et al.*, 2006). El screening fitoquímico fue realizado en el Laboratorio de análisis químico de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). Los procedimientos estándares para la marcha fitoquímica mostraron para saponinas (producción de espuma) = -; taninos (Gelatina/FeCl₃) = -; flavonoides (Shinoda) = -;

esteroides (Liebermann B) = -; quinonas (Bornträger) = -; fenoles (Rosenheim) = -; alcaloides (Dragendorff/Mayer) = + y aminoácidos (Ninhidrina) = +.

Tanto para el Parasín y para la Leche de oje, se emplearon las siguientes cinco concentraciones a partir del producto comercial, los cuales se diluyeron en el medio ADaM: 0.156 %, 0.313%, 0.625%, 1.25% y 2.5 %.

Quantel-Plus®: Producto elaborado por los laboratorios Farminustria®. Es un comprimido compuesto por dos ingredientes activos (ia): praziquantel (50 mg) y albendazol (300 mg). El praziquantel tiene un CAS de 55268-74-1 y su solubilidad en agua es de 400 mg L⁻¹. El albendazol tiene un CAS 54965-21-8 y una solubilidad en agua de 0.42 g L⁻¹. Ambos actúan como antihelmínticos, causando la disrupción del metabolismo del helminto, incluyendo la disminución de energía, que inmoviliza y posteriormente mata el helminto sensible. Para el praziquantel se utilizó las siguientes cinco concentraciones en orden creciente: 15.63, 31.25, 62.5, 125 y 250 mg L⁻¹. En cambio, para el albendazol se usó las siguientes cinco concentraciones en orden creciente: 93.75, 187.5, 375, 750 y 1500 mg L⁻¹, los cuales se diluyeron en el medio ADaM.

Organismo prueba *Daphnia magna*

Hembras adultas de esta especie se obtuvieron del acuario "Cleo" procedente del distrito de Lince, Lima, Perú, y se llevaron al laboratorio en recipientes plásticos de 2 L de capacidad. Hembras partenogénicas se colocaron en el medio nutritivo ADaM. La preparación del medio se realizó de la siguiente forma: 9.9 g de sales obtenidas por evaporación del agua de mar se adicionaron a 60 L de agua de grifo de clorinada, reposada y hiperoxigenada durante 24 h. Luego se agregó 138 mL de una solución de cloruro de calcio (117.6 g · L⁻¹), 132 mL de una solución de bicarbonato de sodio (25.2 g · L⁻¹) y 6 mL de una solución de Oxido de Selenio (0.07 g L⁻¹) (Klüttgen *et al.*, 1994). Los cultivos parciales se mantuvieron a una temperatura de 21± 2°C y a un fotoperiodo aproximadamente de 12:12. El oxígeno disuelto tuvo una concentración sobre 6 mg·L⁻¹ (Castillo, 2004). Para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* se empleó cohortes de neonatos (< 24 h de nacidos). La duración total de la prueba fue de 48 h de exposición para los antiparasitarios y para los dos colorantes. En adición, para los dos colorantes se dieron lecturas a 96 h. Se empleó un factor de dilución de 0.5. A cada envase circular de 250 mL se procedió a agregar 100 mL de cada una de las concentraciones de las sustancias químicas empleadas, a los que se transfirieron diez neonatos de *D. magna*. Se usó como criterio de mortalidad la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco a 15 s de observación al microscopio

estereoscopio. Antes de efectuar las lecturas se agitó los envases en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posaban inmóviles en el fondo (Castillo, 2004).

Análisis de datos

Las valores de CL₅₀ en mg · L⁻¹ para el verde malaquita y para el azul de metileno de otras especies de crustáceos acuáticos fue obtenido de una base de datos electrónica (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp). Las pruebas de toxicidad de los antiparasitarios y de los colorantes de importancia en la acuicultura sobre *D. magna* se evaluaron en cinco concentraciones más el control en el medio nutritivo ADaM, con cuatro repeticiones, en un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA): 6 x 4. La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arco seno. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la mortalidad corregida se realizaron mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando fue menor al 20 % (Macedo *et al.*, 1997). Las CL(E)₅₀ se calcularon usando el programa computarizado Probit versión 1.5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los resultados para los estadísticos descriptivos e inferenciales se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

Resultados

Colorantes

Se observó un incremento en los valores de CL₅₀ en mg·L⁻¹ para el verde de malaquita y para el azul de metileno a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición sobre *D. magna* (Figura 1). Para el verde de malaquita, el valor de CL₅₀ a 24 h fue 9.27 mg·L⁻¹, estadísticamente diferente a los valores de 48 h (CL₅₀ = 4.65 mg·L⁻¹), 72 h (CL₅₀ = 3,23 mg·L⁻¹) y 96 h de exposición (CL₅₀ = 2.97 mg·L⁻¹) (F= 32.61; P = 0.000) (Figura 1). Para el azul de metileno, el valor de CL₅₀ a 24 h fue 2.37 mg·L⁻¹, estadísticamente diferente al valor de 48 h de exposición (CL₅₀ = 1.20 mg·L⁻¹), siendo a su vez este último diferente al de 72 h (CL₅₀ = 0.54 mg·L⁻¹) y 96 h de exposición (CL₅₀ = 0,38 mg·L⁻¹) sobre *D. magna* (F= 53.83; P = 0.000) (Figura 1). Para todos los periodos de exposición, existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CL₅₀ para el verde de malaquita y para el azul de metileno a las 24 h (t= 7.12; P=0.000), a las 48 h (t= 10.09; P=0.000), a las 72 h (t= 12.61; P=0.000) y a las 96 h de exposición sobre *D. magna* (t= 25.16; P=0.000).

Antiparasitarios

Los porcentajes de mortalidad de *D. magna* a las cinco concentraciones evaluadas para los productos antiparasitarios comerciales: Parasín y leche de oje son indicados en la Figura 2. Los valores de CL₅₀ y los límites de confianza superior e inferior fueron 1.34 % (0.81 % - 2.04 %) y 0.99 % (0.67 % - 1.20 %) para parasin, y 0.53 % (0.31 %- 0.79 %) y 0.07 % (0.01 % - 0.12 %) para leche de oje a 24 h y 48 h de exposición, respectivamente. La leche de oje presentó mayor toxicidad según los valores de CL₅₀ a 24 h de exposición y a 48 h de exposición que el producto comercial Parasín. Las Figuras 3 y 4 nos muestran que existen diferencias en los valores de CL₅₀ para el praziquantel (CL_{50-24h} =79.80 mg·L⁻¹; CL_{50-48h} = 30.07 mg·L⁻¹) y para el albendazol (CL_{50-24h} =478.6 mg·L⁻¹; CL_{50-48h} = 180.4 mg·L⁻¹) a 24 h y a 48 h de exposición, respectivamente.

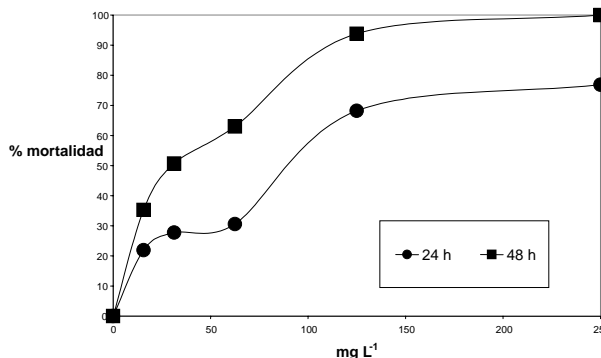


Figura 3. Curvas de mortalidad de *Daphnia magna* por acción del Praziquantel.

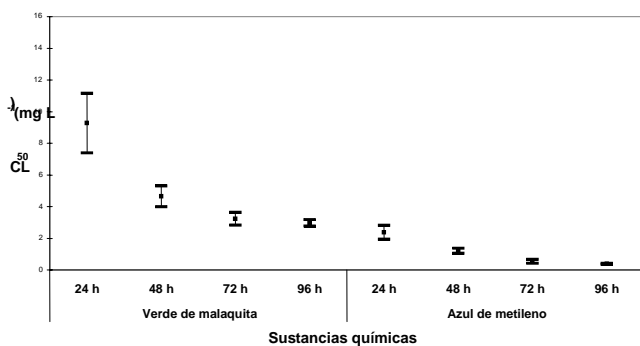


Figura 1. Valores de CL₅₀ del verde de malaquita y del azul de metileno sobre *Daphnia magna* entre 24 h y 96 h de exposición.

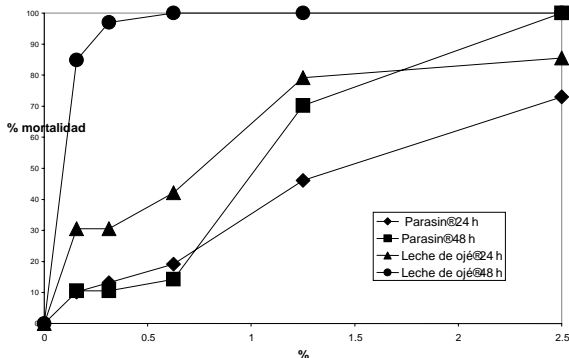


Figura 2. Curvas de mortalidad de *Daphnia magna* por acción del Parasín y de la Leche de oje.

Discusión
Colorantes

Para el caso del verde de malaquita, un análisis comparativo con 40 valores de CL₅₀ para 17 especies diferentes de crustáceos acuáticos, ubica a la pulga de agua *D. magna* en la posición 25, siendo la décima especie más sensible al verde de malaquita (Tabla 1). El valor de CL₅₀ de 96 h de *D. magna* es más tóxico que la CL₅₀ de 10 mg·L⁻¹ del protozooario parásito apicomplexa *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier 1950) Levine 1978 de la ostra *Crassostrea virginica* Gmelin 1791 (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp) y del monogeneo *D. vastator* en *Cyprinus carpio* (Molnar, 1995). Sin embargo, recomendaciones de su uso como antiséptico en peces, lo recomiendan en baños de 0.10 a 0.15 mg·L⁻¹ de verde de malaquita, por lo que bajo estas condiciones no se estaría produciendo ningún riesgo para el ambiente. En adición, se han observado en peces para el verde de malaquita valores de toxicidad que fluctúan entre 0.066 a 1 mg·L⁻¹, siendo *Clarias macrocephalus* Günther 1864 la especie más sensible y *Heteropneustes fossilis* (Bloch 1794) la menos sensible entre cinco especies de peces (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp). El verde de malaquita a 6 mg·L⁻¹ no produjo ningún efecto significativo sobre la bacteria *Vibrio fischeri* (Beijerinck 1889) (Hernando *et al.*, 2007). El uso del verde de malaquita no está permitido en varios países del mundo, debido a que se considera que tiene un efecto altamente tóxico, y debido a los residuos persistentes en el ambiente acuático al emplearse en terapias de inmersión (GESAMP, 1997; Andersen *et al.*, 2006). Por ende, Schmahl *et al.* (1992) recomiendan que, para reducir el riesgo de las terapias de inmersión por verde de malaquita en peces ornamentales como *Paracheirodon axelrodi* (Schultz

1956), la medicación debe ser a través de la alimentación.

Para el caso del azul de metileno, el análisis comparativo con 6 valores de CL₅₀ para tres especies diferentes de crustáceos, ubica a la pulga de agua *D. magna* en la posición primera en términos de sensibilidad (Tabla 2). En adición, se han observado en peces para el azul de metileno valores de toxicidad que fluctúan entre 1 a 188 mg·L⁻¹, siendo *Morone saxatilis* (Walbaum 1792) el pez mas sensible y *H. fossilis* el menos sensible entre 10 especies ícticas (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp). Se ha registrado la presencia de serios problemas de contaminación acuática por el azul de metileno al reducir la penetración de la luz y la fotosíntesis (Waranusantigui *et al.*, 2003).

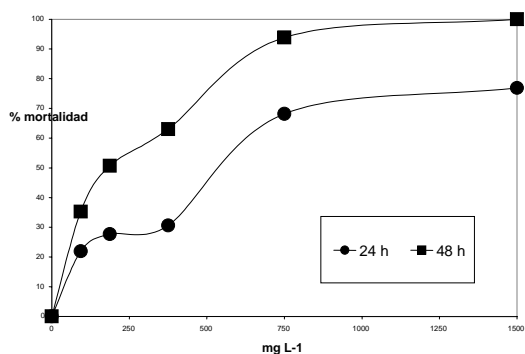


Figura 4. Curvas de mortalidad de *Daphnia magna* por acción del albendazole.

Tabla 2. Valores comparativos de CL₅₀ con especies de crustáceos acuáticos expuestos al azul de metileno.

Especie de crustáceo	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Tiempo de exposición (h)	Estadio
<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820 *	0.38	96	neonato
<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	1.33	72	neonato
<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	2.26	48	neonato
<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	4.93	24	neonato
<i>Homarus gammarus</i> Linnaeus, 1758	10	20	juveniles
<i>Penaeus californiensis</i> (Holmes, 1900)	75	1	zoea

* = presente estudio.

Antiparasitarios

El producto leche de oje presentó mayor toxicidad en *D. magna* según los valores de CL₅₀ que el producto comercial Parasín. La diferente composición de ambos antihelmínticos naturales explicaría los resultados obtenidos. El producto comercial "Leche de oje" está compuesto por dos plantas: leche de oje y hierba buena. En cambio el producto comercial Parasín tiene en su composición tres plantas: semillas de zapallo, semillas de papaya y hierba buena. El látex

de leche de oje tiene mayor toxicidad que las semillas del zapallo y de la papaya (Díaz *et al.*, 2004; Hansson *et al.*, 2005).

La toxicidad del albendazol está relacionada con su modo de acción como benzimidazólico, al actuar como un tóxico mitótico en la división celular que desagrega los cromosomas en las células hijas, produciendo aneuploidia, y a su parámetro de lipofilicidad (Oh *et al.*, 2006). Se ha observado que el valor de CL₅₀ obtenido en el presente estudio en *D. magna* para el benzimidazólico, albendazol es significativamente más alto que un estudio registrado para *D. magna* de 67.9 ug L⁻¹ a 48 h de exposición (Oh *et al.*, 2006). Sin embargo, las diferentes condiciones del ensayo como la preparación de la solución madre del albendazol (pureza 98% de Sigma-Aldrich), el empleo del acetato al 5% como solvente, y el punto final de observación en las pulgas de agua, la inmovilidad condicionarían los resultados comparativos (Oh *et al.*, 2006). Con el fin de determinar el riesgo en el ambiente acuático del albendazol se usó el cociente de riesgo (CR) (Versteeg *et al.*, 2005; Ankley *et al.*, 2005), por ende se empleó el valor de PEC (Concentración ambiental predicha) para este producto químico para aguas superficiales, existente para los sistemas acuáticos de Alemania y Korea (Koschorreck *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2006) de 0.66 ug L⁻¹, mostrando luego de la aplicación del CR, que divide el valor de PEC sobre el valor de CL₅₀ agudo de 180.4 mg L⁻¹ multiplicado por un valor de 1000 para estudios agudos (EC, 2003), lo cual determina la ausencia de riesgo del albendazol en el ambiente acuático. Sin embargo, un refinamiento en la estimación de los valores de PEC para el sistema de aguas superficiales del Perú es requerido para definir más adecuadamente el riesgo del albendazol en estas aguas.

Para el praziquantel, se ha observado un valor de CL_{50-48h} de 30.07 mg·L⁻¹, el cual es similar al obtenido para un estudio previo con *D. magna* (CL₅₀ = 31.6 mg·L⁻¹) (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp). Se ha observado en peces valores de toxicidad para el praziquantel que fluctúan entre 13.4 a 13480 mg·L⁻¹, siendo *Clarias gariepinus* (Burchell 1822 y *Pimephales promelas* Rafinesque 1820, la especie íctica mas sensible y la menos sensible entre cuatro especies de peces, respectivamente (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp).

Literatura citada

- Akdogan M., Tamer M.N., Cure E., Cure M.C., Koroglu B.K. & Delibas N. 2007. Effect of spearmint (*Mentha spicata* Labiatae) teas on androgen levels in women with hirsutism. *Phytotherapia Research* 20: (In press).
- Alvarez-Sánchez M.A., Mainar-Jaime R.C., Pérez-García J. & Rojo-Vázquez F.A. 2006. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*. 159: 424-425.

- Andersen W.C., Turnipseed S.B. & Roybal J.E. 2006. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. *Journal of Agriculture and Food Chemical*. 54: 4517-4523.
- Ankley G.T., Black M.C., Garric J., Hutchinson T.H. & Iguchi T. 2005. A framework for assessing the hazard of pharmaceutical materials to aquatic species. pages 183-238. *en: Human pharmaceuticals assessing the impacts on the aquatic ecosystems*. Williams, R.T. (ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Pensacola (FL), USA.
- Amorim C.Z., Marques A.D. & Cordeiro R.S. 1991. Screening of the antimetabolic activity of plants of the Cucurbitaceae family. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 86 Suppl. 2: 177-180.
- Backhaus T., Scholze M. & Grimme L.H. 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic Toxicology*. 49: 49-61.
- Belkind-Valdovinos U., Belkind-Gerson J., Sánchez F.D., Espinoza R.M.M. & Lazcano P.E. 2004. Nitazoxanide vs albendazole against intestinal parasites in a single dose and for three days. *Salud Pública Mexicana*. 46: 333-340.
- Boxall A.B.A., Fogg L.A., Lindsay A.F., Kay P., Blakwell P.A., Pemberton E.J. & Croxford A. 2003a. Prioritization of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicology Letters*. 142: 207-218.
- Boxall A.B.A., Kolpin D.W. & Halling-Sørensen B. 2003b. Are veterinary medicines causing environmental risk? *Environmental Science and Technology*. 37: 286A-294A.
- Boxall A.B.A. & Long C. 2005. Veterinary medicines and the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24: 759-760.
- Castillo G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA. México.
- Chapman P.M. 2006. Emerging substances- emerging problems? *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25: 1445-1447.
- Christensen A.M., Ingersley F. & Baun, A., 2006. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25: 2208-2215.
- Clifton J. 2nd & Leikin J.B. 2003. Methylene blue. *American Journal of Therapeutics*. 10: 289-291.
- Costamagna S.R., Dupin J., Vaylet S. & Pellegrino P. 2004. Evaluación del fijador-colorante azul de metileno para el diagnóstico directo de *Trichomonas vaginalis*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 38: 307-309.
- Daughton C.G. & Ternes T.A. 1999. Pharmaceutical and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*. 107: 907-938.
- Díaz O. D., Lloja L.L. & Carvajal Z.V. 2004. Preclinical studies of *Cucurbita maxima* (pumpkin seeds) a tradicional intestinal antiparasitic in rural areas. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 24: 323-327.
- De Amorin A., Borba H.R., Carauta J.P., Lopes D., Kaplan M.A. 1999. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *Journal of Ethnopharmacology*. 64: 255-258.
- European Commission (EC). 2003. Technical guidance document on risk assessment. EUR 20418 EN/2. Joint Research Centre, European Commission, Italy.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint group of experts on the scientific aspects of marine environmental Protection. 1997. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. *Red.Stud.GESAMP*. 65: 40
- Giraldo J., Rojas J., Huamaní L., Espinoza S. & Girio Z. 2006. Efecto antihelmíntico de *Ficus antihelmintica* Mart (Ojé) (Moraceae) y *Cyclanthera pedata* (L.) Schrad (Caigua) (Cucurbitaceae) sobre *Hymenolepis nana* (Siebold, 1852) (Cestoda: Hymenolepididae). *Biologist (Lima)*. 4: 1-2.
- Grant D.C., Papoutsoglou C. & Saroglia Q. 2001. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. *Journal of Applied Ichthyology*. 17: 173-180.
- Guarrera P.M. 1999. Tradicional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*. 68: 183-192.
- Halling-Sørensen B., Nor Nielsen S., Lanzky P.P.F., Ingerslev F., Lützhøft H.C. & Jørgensen S.E. 1998. Occurrence, fate, and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*. 36: 357-393.
- Hansson A., Zelada J.C. & Noriega H.P. 2005. Reevaluation of risk with use of *Ficus insipida* latex as a traditional anthelmintic remedy in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 98: 251-257.
- Hempel H., Scheffczyk A., Schallnab H.J., Lumaret J.P., Alvinerie M. & Römbke J. 2006. Toxicity of four veterinary parasiticides on larvae of the dung beetle *Aphodius constans* in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25: 3155-3163.
- Hernando M.D., De Vettori S., Martinez B.M.J. & Fernandez A.A.R. 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*. 8: (In press).
- Holm-Martin M., Levot G.W. & Dawson K.L. 2005. Control of endoparasites in horses with a gel containing moxidectin and praziquantel. *Veterinary Record*. 156: 835-838.
- Iannacone J., Alvarino L., Soto J.C. & Salcedo C. 2007. Efecto toxicológico del Sachayoco, *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) sobre *Daphnia magna* y sobre dos controladores biológicos de Plagas agrícolas. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 2: 15-25.
- Iannacone J., Caballero C.R. & Rentería J.A. 1999. La técnica de precoloración de Walker para evaluar *Plasmodium vivax* Grassi y *Plasmodium malariae* Laveran en comunidades asháninkas en Satipo (Junín, Perú). *Revista peruana de Biología*. 6: 171-180.
- Imai H., Osawa K., Yasuda H., Hamashima H., Arai T. & Sasatsu M. 2001. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios*. 106 Suppl: 31-39.
- Jjemba P.K. 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63: 113-130.
- Kallquist T., Grung M. & Tollefsen K.E. 2006. Chronic toxicity of 2,4,2', 4'-Tetrabromodiphenil ether on the marine alga *Skeletonema costatum* and the crustacean

- Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry. 25: 1657-1662.
- Karanja D.M.S., Boyer A.E., Strand M., Colley D.G., Nahlen B.L., Ouma J.H. & Secor W.E. 1998. Studies on schistosomiasis in Western Kenya: II. Efficacy of praziquantel for treatment of Schistosomiasis in persons coinfecting with human immunodeficiency virus-1. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 59: 307-311.
- Kim K.H., Lee E.H., Kwon S.R. & Cho J.B. 2001. Treatment of *Microcotyle sebastis* infestation in culture rockfish *Sebastes schlegeli* by oral administration of praziquantel in combination with cimetidine. Disease of Aquatic Organisms. 44: 133-136.
- Klütgen B., Dülmer U., Engels M. & Ratte H.T. 1994. ADaM, an artificial freshwater for culture of zooplankton. Water Research. 28: 743-746.
- Koschorreck J., Koch C. & Ronnefahrt I. 2002. Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU- a regulatory perspective. Toxicology Letters. 131: 117-124.
- Lagarto P.A., Tillán C.J., Vega M.R. & Cabrera G.Y. 1999. Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1: 26-28.
- Lalumera G.M., Calamari D., Galli P., Castiglioni S., Crosa G. & Fanelli R. 2004. Preliminary investigation on the environment occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. Chemosphere. 54: 661-668.
- Leathwick D.M., Miller C.M., Atkinson D.S., Haack N.A., Alexander R.A., Oliver A.M., Waghorn T.S., Potter J.F. & Sutherland I.A. 2006. Drenching adult ewes: implications of anthelmintic treatments pre- and post-lambing on the development of anthelmintic resistance. New Zealand Veterinary Journal. 54: 297-304.
- Lützhøft H.C.H., Halling-Sørensen B. & Jørgensen S.E. 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 36: 1-6.
- Macedo M.E., Consoli R.A., Grande T.S., Dos Anjos A.M., De Oliveira A.B., Mendes N.M., Queiroz R.O. & Zani C.L. 1997. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 92: 565-570.
- Maguiña A.A. & Iannacone J.A. 2000. *Artemia franciscana* Kellog 1906 "Camarón salino" como agente de bioensayo para evaluar cinco extractos crudos de plantas propiedades antiparasitarias. Boletín de la Sociedad Química del Perú. 66: 154-169.
- Molnar K. 1995. Effect of exposure to malachite green solution on common carp fry *Dactylogyrus vastator* (Monogenea) infection. Acta Veterinaria Hungarica. 43: 277-286.
- Moreno H.A., Droppeiman C.V. & Verdejo M.E. 2006. Evaluación de carbón activado producido a partir de lodo generado en una planta de tratamiento de aguas servidas. Información tecnológica. 17: 9-14.
- Oh S.J., Park J., Lee M.J., Park S.Y., Lee J.H. & Choi K. 2006. Ecological hazard assessment of major veterinary benzimidazoles: acute and chronic toxicities to aquatic microbes and invertebrates. Environmental Toxicology and Chemistry. 25: 2221-2226.
- Pareja R.R., Leucona B.G. & Ciriza J.A.F. 2002. Cefalea en un paciente joven. Neurocisticercosis. Medifam. 12: 650-654.
- Reynaldi S., Duquesne S., Jung K. & Liess M. 2006. Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. Environmental Toxicology and Chemistry. 25: 1831-1835.
- Rifici L.M., Cherry D.S., Farris J.L. & Cairns J.Jr. 1996. Acute and subchronic toxicity of methylene blue to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*): implications for aquatic toxicity testing. Environmental Toxicology and Chemistry. 15: 1304-1308.
- Rintamaki K.P., Rahkonen M., Mykra H. & Valtonen E.T. 2005. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. II. Earth ponds at salmonid farms. Disease of Aquatic Organisms. 66: 15-20.
- Schmahl G., Ruider S., Mehlhorn H., Schmidt H. & Ritter G. 1992. Treatment of fish parasites. 9. Effects of a medicated food containing malachite green on *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet 1876 (Hymenostomatida, Ciliophora) in an ornamental fish. Parasitology Research. 78: 183-192.
- Sibat H.F. & Ibañez V.I. 2003. Vascular dementia type binswanger's disease in patients with active neurocysticercosis. Electronic Journal of Biomedicine. 1: 32-42.
- Silveira C.R., Prieto T.A. & Ascencio V.F. 2004. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. Comparative Biochemical and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology. 139: 245-250.
- Srivastava S., Sinha R. & Roy D. 2004. Toxicological effects of malachite green. Aquatic Toxicology. 66: 319-329.
- Stocche R.M., García L.V., dos Reis M.P., Klamt J.G. & Évora P.R.B. 2004. Methylene blue to treat anaphylaxis during anesthesia. Case Report. Revista Brasileira de Anestesiologia. 54: 809-814.
- Stockert J.C. & Herkovits J. 2003. Photodynamic toxicity and its prevention agents in *Bufo arenarum* embryos. Toxicology. 192: 211-218.
- Tripathi A.K., Prajapati V., Aggarwal A. K.K. & Khanuja S.P. 2004. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). Journal of Medical Entomology. 41: 691-698.
- Van de Riet J.M., Murphy C.J., Pearse J.N., Potter R.A. & Burns B.G. 2005. Determination of malachite green and leucomalachite green in a variety of aquaculture products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. Journal of AOAC International. 88: 744-749.
- Versteeg D.J., Alder A.C., Cunningham V.L., Kolpin D.W., Murray-Smith R. & Ternes T. 2005. Environmental exposure modeling and monitoring of human pharmaceutical concentrations in the environment. pages 71-110. *en*: Human pharmaceuticals assessing the impacts on the aquatic ecosystems. Williams, R.T. (ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Pensacola (FL), USA.
- Watt B.E., Proudfoot A.T., Bradberry S.M. & Vale J.A. 2005. Poisoning due to urea herbicides. Toxicological Reviews. 24: 161-166.
- Waranusantigui P., Pokethitiyook P., Kruatrachue M. & Upatham E.S. 2003. Kinetic of basic dye (methylene blue)

- biosorption by giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). Environmental Pollution. 125: 385-392.
- Wollenberger L., Halling-Sørensen B. & Kusk K.O. 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. Chemosphere. 40: 723-730.
- Woodward K.N. 2006. Veterinary pharmacovigilance. Part 3. Adverse effects of veterinary medicinal products in animals and on the environment. Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics. 28: 171-184.
- Yu T.W., Xu M. & Dashwood R.H. 2004. Antimutagenic activity of spearmint. Environmental and Molecular Mutagenesis. 44: 387-393.
- Zilberg D. & Tamar S. 2006. Optimization and validation of a colorimetric assay for *Tetrahymena* sp. survival. Research in Microbiology. 157: 355-35.

Apéndice de tablas

Tabla 1. Valores comparativos de CL₅₀ con especies de crustáceos acuáticos expuestos al verde de malaquita.

Especie de crustáceo	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Tiempo de exposición (h)	Estadio
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.012	96	Zoea
<i>Penaeus stylirostris</i> Stimpson 1874	0.016	24	Nauplio
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.018	72	Zoea
<i>Cancer magister</i> Dana 1852	0.02	96	Zoea
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.03	48	Zoea
<i>Cancer magister</i> Dana 1852	0.04	96	Zoea
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.06	96	Postlarva
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.07	72	Postlarva
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.11	24	Zoea
<i>Cancer magister</i> Dana 1852	0.12	48	Zoea
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.13	96	Mysis
<i>Cancer magister</i> Dana 1852	0.16	48	Zoea
<i>Penaeus semisulcatus</i> de Haan 1844	0.2	24	Postlarva
<i>Penaeus penicillatus</i> Alcock 1905	0.3	24	Zoea
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.33	48	Postlarva
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	0.61	72	Mysis
<i>Penaeus duorarum</i> Burkenroad 1939	0.64	96	NI
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	1	48	Mysis
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (de Man 1879)	1.14	24	Zoea
<i>Penaeus japonicus</i> (Bate 1881)	1.18	24	Zoea
<i>Palaemonetes kadiakensis</i> Rathbun 1902	1.9	96	Zoea
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	2.5	24	Mysis
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	2.51	24	Postlarva
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798	2.9	24	Postlarva
<i>Daphnia magna</i> Straus 1820 *	2.97	96	Neonatos
<i>Cypridiopsis</i> sp.	3.45	96	NI
<i>Metapenaeus ensis</i> (De Haan 1844)	3.73	24	Zoea

<i>Argulus</i> sp.	5	NI	NI
<i>Cypridiopsis</i> sp.	5.86	6	NI
<i>Cypridiopsis</i> sp.	5.86	24	NI
<i>Palaemonetes kadiakensis</i> Rathbun 1902	9.1	24	Zoea
<i>Penaeus schmitti</i> Burkenroad 1936	10	24	Postlarva
<i>Penaeus japonicus</i> (Bate 1881)	10.13	24	Postlarva
<i>Homarus americanus</i> H. Milne Edwards 1837	20	1	4to juvenil
<i>Homarus gammarus</i> Linnaeus 1758	20	1	4to juvenil
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (de Man 1879)	21	24	Postlarva
<i>Penaeus schmitti</i> Burkenroad 1936	46	72	Zoea
<i>Metapenaeus ensis</i> (De Haan 1844)	61	24	Postlarva
<i>Penaeus schmitti</i> Burkenroad 1936	77	48	Zoea
<i>Penaeus schmitti</i> Burkenroad 1936	323	24	Zoea

NI = No indicado. * = presente estudio.

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Particular Ricardo Palma. E-mail: joseiannacone@yahoo.es

² Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle San Marcos 383, Pueblo Libre, Lima, Perú.