



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD
DEL BIODIÉSEL EN RENACUAJOS DE
RANA TORO**

Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802)

Tesis que presenta
Biól. **Claudia Verónica De La Cruz Moreno**
Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Energía y Medio Ambiente

COMITÉ TUTORIAL.

Director. Dra. Guadalupe Barrera Escorcía

Director. Dra. Patricia Ramírez Romero

Asesor. Dra. Xenia Mena Espino

Jurado calificador

Presidente: Dr. Rodolfo Omar Arellano Aguilar

Secretario: Dr. Héctor Barrera Villa Zevallos

Vocal: M. en C. Mario Alejandro Muñoz Nájera

Ciudad de México, 12 de diciembre del 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA UNIDAD
IZTAPALAPA
POSGRADO EN ENERGÍA Y
MEDIO AMBIENTE

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD
DEL BIODIÉSEL EN RENACUAJOS DE
RANA TORO *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).**

TESIS

**Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
(ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE)**

PRESENTA:

Biól. Claudia Verónica De La Cruz Moreno.

COMITÉ TUTORIAL.

Director. Dra. Guadalupe Barrera Escorcía.

Director. Dra. Patricia Ramírez Romero

Asesor. Dra. Xenia Mena Espino

Ciudad de México, 12 de diciembre del 2017

Agradecimientos

La Maestría en Ciencias (Energía y Medio Ambiente) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio 003893; por lo que se agradece la beca recibida para la realización de esta tesis llamada “Evaluación de la toxicidad del biodiésel en renacuajos de rana toro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Además, esta investigación fue sustentada por los proyectos: “El Estudio Ecotoxicológico de la zona costera del Golfo de México: Fase II”, (UAM-I, convenio No.14712085) e “Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental” (UAM-I e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático [2010-2018]).

Este estudio se realizó en las siguientes instancias:

Laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM - Iztapalapa.

Laboratorio de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM - Iztapalapa.

Laboratorio de Bioensayos del INECC (Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático), situado en el edificio W de la UAM - Iztapalapa.

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a mis directoras de tesis, las doctoras Patricia Ramírez Romero y Guadalupe Barrera Escorcía, quienes contribuyeron con sus conocimientos para la elaboración de este proyecto y me brindaron su apoyo, paciencia y valioso tiempo. Asimismo agradezco sus comentarios, que fueron convenientes para mi desarrollo académico, así como el haberme permitido el acceso al equipo y al material necesario para el desarrollo de esta investigación. También le agradezco a la doctora Xenia Mena Espino por su asesoría en la realización de esta tesis.

Asimismo, agradezco a Ulises Beltrán Cruz por su colaboración durante el curso sobre la importancia económica que tiene la especie estudiada en este ensayo y por su ayuda para contactar al proveedor de los ejemplares de *Lithobates catesbeianus*. De igual manera quiero expresar mi gratitud al señor Juan Martínez, quien con amabilidad proporcionó los organismos.

Es importante reconocer la colaboración de muchos compañeros del laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Hidrobiología de la UAM - I, puesto que gracias a su apoyo, participación o asesoría, fue posible la realización de este proyecto. De esta manera extendiendo mi reconocimiento a las siguientes personas.

Agradezco a la Ing. Ambiental Laura Guadalupe Elizalde Ramírez, quien me apoyó en el montaje de las técnicas de evaluación de los biomarcadores vinculados a la investigación, la extracción del hígado de los organismos y la determinación de proteínas.

Al Ing. Ambiental Isidro Arellano López, por su colaboración en la aplicación de las técnicas para determinar estrés metabólico y actividad enzimática de la catalasa, así como en la elaboración de los reactivos que se utilizaron.

A la M. en C. Silvia Cecilia Bastidas Bonilla, quien me brindó de su tiempo para la elaboración de los reactivos para la evaluación de biomarcadores y en el montaje de las técnicas.

Al Biólogo Fernando Alberto Mares Guzmán, quien apoyo con su conocimiento para la determinación del órgano de estudio (hígado), el cual se utilizó en la evaluación de los biomarcadores.

A los Hidrobiólogos Gabriela Alejandra Vargas Cruz y Sinuhé Palancares García, quienes me asistieron en la medición de los organismos y de los parámetros fisicoquímicos durante la evaluación de los biomarcadores.

Y por último al M. en C. Mario Alejandro Muñoz Nájera, quien me enseñó a sacrificar los animales y a interpretar los datos estadísticos.

Además de las asesorías mencionadas, agradezco al Dr. Héctor Barrera Villa Zevallos por la cuidadosa revisión al manuscrito y por sus correcciones al mismo.

Agradecimientos personales

Agradezco a mis familiares y amigos, quienes me acompañaron y apoyaron fielmente para no desistir, a pesar de los días en que las situaciones se complicaron, y con quienes compartí mis nuevas experiencias y las satisfacciones de cada uno de los logros que se concretaron. Algunos se desvelaron y madrugaron con tal de continuar en esta travesía de aventuras y enseñanzas; logrando así el cumplimiento de cada uno de los objetivos que en este trabajo se plantearon.

Por lo mencionado con anterioridad reitero mi agradecimiento, porque con ello se cumple una nueva meta en mi vida, con la satisfacción que esto conlleva.

¡Gracias a todos!

Comité tutorial

Co-director:

Dra. Guadalupe Barrera Escorcía. Laboratorio de Ecotoxicología. Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana.

Co-director:

Dra. Patricia Ramírez Romero. Laboratorio de Ecotoxicología. Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana.

Asesor:

Dra. Xenia Mena Espino. Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica. Universidad Autónoma Metropolitana.

Índice General

Contenido

Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
1. Antecedentes	8
1.1 Aparición del biodiésel.....	8
1.2 Datos históricos e importancia ecológica de los anfibios	9
1.3 Estudios que se han realizado con anfibios	9
1.4 Organismo de estudio	12
1.5 Biomarcadores utilizados para la evaluación de efectos de diésel y biodiesel	13
2. Pregunta de investigación e hipótesis.....	16
2.1 Pregunta de investigación	16
2.2 Hipótesis	16
3. Objetivos	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos particulares.....	17
4. Metodología	18
4.1 Recolección de organismos	19
4.2 Mantenimiento de los organismos en el laboratorio	20
4.3 Obtención de la fracción soluble de los combustibles	21
4.4 Métodos utilizados en las dos fases experimentales.....	22
4.5. Evaluación de la toxicidad aguda (prueba preliminar)	23
4.5.1 Fase de exposición (96 h).....	23
4.5.2 Fase de depuración.....	24
4.6 Evaluación de los renacuajos en la prueba subletal (prueba definitiva)	24
4.6.1 Fase de exposición	24
4.6.2 Fase de depuración	25
Estrés metabólico a través de la relación O:N.....	25
Estrés oxidativo a través de la actividad enzimática de la catalasa	28
Análisis estadísticos.....	29
5. Resultados y discusión	30
5.1 Colecta de organismos	30

5.2 Mantenimiento de los organismos en el laboratorio	30
5.3 Prueba preliminar (evaluación de la toxicidad aguda).....	31
5.4 Prueba de toxicidad definitiva (toxicidad subletal)	36
5.5 Evaluación de biomarcadores	38
5.6 Integración de resultados.....	61
6 Conclusiones.....	79
7. Perspectivas y recomendaciones	81
8. Bibliografía	82

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Lithobates catesbeianus</i> , como organismo de prueba.	13
Figura 2. Modelo conceptual de la evaluación de los efectos de las fracciones solubles del diésel, el biodiésel (B100) y la mezcla B20 sobre <i>L. catesbeianus</i>	18
Figura 3. Peceras de 35 L con organismos en periodo	20
Figura 4. Obtención de la fracción soluble (FS) de los tres contaminantes que se utilizaron.	22
Figura 5. Montaje del experimento.	23
Figura 6. Montaje de la prueba de estrés metabólico.	26
Figura 7. Mortalidad acumulada en la fase de depuración (31 días).	35
Figura 8. Hígados de organismos en el periodo de recuperación (después del periodo de exposición de 96 h a las fracciones solubles del biodiésel (FSB)); organismo control (sano) (a) organismo con poco daño (b); organismo con daño evidente (c).	36
Figura 9. Consumo de Oxígeno (mg/h/ gPS) en los diferentes días (d) del bioensayo.	39
Figura 10. Excreción nitrogenada (mg/h/gPS) de los organismos durante el bioensayo.	40
Figura 11. Relación O: N de los organismos, evaluado en diferentes días del bioensayo.	41
Figura 12. Consumo de Oxígeno (mg/h*gPS) de los organismos control.	42
Figura 13. Consumo de Oxígeno (mg/h*gPS), de los organismos expuestos a las fracciones solubles del diésel (FSD); al 0.06% (a) y al 0.12% (b), obtenidos los días (d) de bioensayo.	43
Figura 14. Consumo de Oxígeno (mg/h*gPS), en organismos expuestos a las fracciones solubles del biodiésel (FSB); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b)	44
Figura 15. Consumo de oxígeno (mg/h*gPs), en organismos expuesto a las fracciones solubles de la mezcla (FSM); a la 0.06% (a) y a la FSM 0.12 % (b)	44
Figura 16. Excreción nitrogenada (mg/h*gPS) de los organismos control.	45
Figura 17. Excreción nitrogenada (mg/h/gPS) de los organismos expuestos a las fracciones solubles del diésel (FSD); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).	46
Figura 18. Excreción nitrogenada (mg/h gPS), de los organismos expuestos a las fracciones solubles del biodiesel (FSB); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).	46
Figura 19. Excreción nitrogenada (mg/h/ gPs), de los organismos expuestos a las fracciones solubles de la mezcla (FSM); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b)	47
Figura 20. Relación O:N de los organismos control.	48
Figura 21. Relación O:N de los organismos expuestos a la fracciones solubles del diésel (FSD); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).	48
Figura 22. Relación O:N en los organismos expuestos a las fracciones solubles del biodiesel (FSB); a la 0.06% (a) y a la 0.12%. (b).	49
Figura 23. Relación O: N, de los organismos expuestos a las fracciones solubles de la mezcla (FSM); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).	50

Figura 24. <i>Parámetros fisiológicos de los organismos control y los expuestos el día dos: Consumo de oxígeno (mg/h*gPS) (a) y excreción nitrogenada (mg/h*gPS) (b).</i>	52
Figura 25. <i>Relación O:N de los organismos que se evaluaron el día dos.</i>	53
Figura 26. <i>Parámetros fisiológicos de los organismos control y los expuestos el día 15: Consumo de oxígeno (mg/h*gPS) (a) y excreción nitrogenada (mg/h*gPS) (b).</i>	54
Figura 27. <i>Relación O:N de los organismos que se evaluaron el día 15.</i>	55
Figura 28. <i>Contenido de proteínas.</i>	57
Figura 29. <i>Proteínas (µg de proteína/ml de solución) los días uno y 15.</i>	58
Figura 30. <i>Contenido de catalasa (U/mg de proteína) los días uno (a), dos (b) y 15 (c).</i>	60
Figura 31. <i>Contenido de catalasa (U/mg de proteína) en los días cuatro (a) y 30 (b).</i>	60
Figura 32. <i>Correlaciones entre el peso y la longitud (a), entre el peso y la anchura (a) y entre la anchura y la longitud (b).</i>	61
Figura 33. <i>Correlaciones entre temperatura y oxígeno disuelto (a) y entre temperatura y pH (b).</i>	62
Figura 34. <i>Correlación entre pH y OD del agua.</i>	62
Figura 35. <i>Correlaciones entre temperatura y excreción nitrogenada (a) y entre temperatura y relación O:N (b).</i>	63
Figura 36. <i>Correlaciones entre el consumo de oxígeno y el oxígeno disuelto (a) y entre el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada (b).</i>	64
Figura 37. <i>Correlación entre el oxígeno disuelto y la razón O:N.</i>	64
Figura 38. <i>Correlaciones entre el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada (a) y entre la excreción nitrogenada y la razón O:N (b).</i>	65

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Estudios ecotoxicológicos realizados en anfibios.</i>	10
<i>Tabla 2. Estudios relacionados con la toxicidad de combustibles (diésel, biodiésel y mezclas) en diversos organismos.</i>	11
<i>Tabla 3. Calidad del agua requerida para el mantenimiento de larvas.</i>	21
<i>Tabla 4. Diseño experimental en la fase definitiva de exposición subletal.</i>	25
<i>Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos registrados en el lugar de colecta.</i>	30
<i>Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos para el mantenimiento de los organismos.</i>	31
<i>Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos registrados en las pruebas de toxicidad aguda (promedio \pm desviación estándar).</i>	32
<i>Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de los organismos durante la fase de exposición aguda (96 h).</i>	34
<i>Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos del agua de las cámaras (promedio \pm desviación estándar).</i>	37
<i>Tabla 10. Parámetros morfológicos (promedio \pm desviación estándar).</i>	38
<i>Tabla 11. Parámetros fisiológicos determinados en los diferentes días durante el bioensayo (promedio \pm desviación estándar).</i>	39
<i>Tabla 12. Parámetros fisiológicos de los organismos (Valores promedio).</i>	41
<i>Tabla 13. Análisis estadístico de los parámetros fisiológicos los días del ensayo.</i>	51
<i>Tabla 14. Parámetros fisiológicos del día 2 de exposición (promedios \pm desviaciones estándar).</i>	52
<i>Tabla 15. Parámetros fisiológicos del día 15 de exposición (promedios \pm desviaciones estándar).</i>	54
<i>Tabla 16. Contenido de proteínas (mg de proteína/ml de solución, promedio \pm desviación estándar).</i>	56
<i>Tabla 17. Actividad enzimática de la catalasa (media \pm desviación estándar) en las diferentes condiciones experimentales.</i>	59

Resumen

Los combustibles como el diésel generan contaminación, por ello se impulsa el uso de biocombustibles alternativos como el biodiésel y sus mezclas, que se consideran menos tóxicos. La rana toro *L. catesbeianus* (Shaw, 1802) es un bioindicador sensible a la contaminación acuática en su etapa de vida temprana. El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar la toxicidad del diésel, el biodiésel (B100) y una mezcla (B20) en renacuajos de esta especie. Se realizaron dos pruebas (aguda y subletal) con las fracciones solubles de los tres combustibles. Ambos bioensayos tuvieron un periodo de exposición de 96 h y un mes de recuperación. Se hicieron recambios del 50% del volumen cada 48 h. Las concentraciones de la prueba aguda fueron: 0.00, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 y 1.00 % de la fracción soluble de cada combustible, con tres réplicas. Se utilizaron 240 animales (cinco por cámara) y se registró la mortalidad. No se alcanzó el 50% de mortandad a las 96 h, sin embargo, se obtuvo una $CL_{50-96 h}$ de 2.85% con la fracción soluble del diésel y una $CL_{1-96 h}$ de 0.27% de este mismo contaminante. Esto permitió seleccionar las concentraciones 0.06 y 0.12% para la prueba subletal; en ésta se utilizaron 246 organismos (12 por cámara). Se analizaron el estrés metabólico (consumo de oxígeno y excreción nitrogenada) y el estrés oxidativo (actividad de la catalasa) los días uno, dos, cuatro (exposición), 15 y 30 (recuperación). En los días dos y 15 los combustibles incrementaron la excreción nitrogenada y disminuyeron la relación O:N, de los renacuajos, lo que significa un importante estrés metabólico. Sin embargo, el día 15 sólo los animales expuestos al diésel 0.06% y la mezcla 0.06% mostraron estrés metabólico, aunque menor que el del día dos.

Se determinó el estrés oxidativo el día cuatro en los organismos expuestos a la fracción soluble (FS) (en una concentración de 0.12%) de diésel y de la mezcla; el día 30 se observó el efecto en todos los renacuajos, excepto en los expuestos a la FS 0.06% del biodiésel.

Se concluye en este estudio que si bien el biodiésel y las mezclas fueron menos tóxicos que el diésel, se debe considerar que en ambos casos, los daños se observaron también en el periodo de recuperación. Por lo que se sugiere realizar evaluaciones inmediatas y a mediano plazo en caso de un derrame. Palabras clave: toxicidad, diésel, biodiésel, *Lithobates catesbeianus*, biomarcadores.

Abstract

Fossil fuels like diesel generate pollution; therefore the use of alternative fuels, such as biodiesel and their mixtures, which are considered less toxic, is being promoted. Bull frog *L. catesbeianus* (Shaw, 1802) is considered a sensitive bioindicator for aquatic pollution in its early life stages. The objective of this work was to evaluate and compare the toxicity of diesel, biodiesel (B100) and a mixture (B20), in tadpoles of this species. Two tests were performed (acute and sublethal) using the soluble fraction of the three fuels. Both bioassays included a 96 h exposure period and a month recovery lapse. Fifty percent of the exposure solution was renewed every 48 h. The concentrations used in the acute toxicity test were: 0.00, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 and 1.00 % for each fuel, (with three replies). Two hundred and forty animals (five per chamber) were used and mortality was recorded. Mortality at 96 h did not reach 50%, however, an LC_{50-96h} of 2.85% resulted with the diesel soluble fraction; and a LC_{1-96h} of 2.273%. This allowed the selection of 0.06 and 0.12% concentrations for the sublethal toxicity tests; 246 organisms (12 per camera) were included. Metabolic stress (oxygen consumption and nitrogen excretion) and oxidative stress (catalase activity) were analyzed on days one, two, four (exposure period), 15 and 30 (recovery phase). On days two and 15, fuels increased nitrogenous excretion and decreased the O:N ratio, reflecting important metabolic stress. However, on day 15 only animals exposed to 0.06% diesel and 0.06% blend showed high nitrogenous excretion and metabolic stress, although less than on day two. Oxidative stress was detected in the 0.12% soluble fraction of diesel and blend the day four, on the day 30 the effect was observed in all concentrations, except in biodiesel at 0.06% concentration. In conclusion, while biodiesel and the blend were less toxic than diesel, the damage persisted in both tests through the recovery period. Therefore, it is suggested to carry out immediate and medium-term evaluations in case of a spill.

Keywords: toxicity, diésel, biodiésel, *Lithobates catesbeianus*, biomarkers.

Introducción

Durante años, los factores bióticos (animales, plantas y microorganismos) y los abióticos (agua, suelo y aire) de los ecosistemas naturales han sido expuestos a diversos compuestos que se introducen al ambiente como consecuencia de las actividades antropogénicas. Un ejemplo son las acciones realizadas en las industrias petroleras (extracción, transporte y almacenamiento de petróleo y sus derivados; además de la producción y explotación de los mismos) que ponen en riesgo a los ecosistemas. Durante estos procesos se pueden contaminar mares, ríos, lagos, etc., como consecuencia de fugas y derrames, es por ello que se consideran como algunas de las actividades que representan mayor riesgo ambiental a nivel mundial.

La magnitud del riesgo ecológico y la toxicidad que los combustibles generan depende de su solubilidad en el agua; las fracciones insolubles o poco solubles de algunos hidrocarburos líquidos en fase no acuosa (NAPL, por sus siglas en inglés *Non-aqueous phase liquids*) se infiltran en el subsuelo y pueden alcanzar el agua subterránea, lo cual representa un mayor riesgo por sus efectos en el ambiente y en la salud humana. Estos compuestos se clasifican dependiendo de su densidad con respecto al agua en: más densos (como el petróleo puro) y más ligeros (como la gasolina, el diésel, el benceno, el tolueno, el etilbenceno y el xileno) que el agua (Huaiquilaf, 2008). Las fases solubles de estos hidrocarburos con baja densidad forman capas gruesas en la parte superior de los cuerpos de agua, mismas que cubren el cuerpo de los organismos y pueden causarles la muerte (WHO, 1996).

El diésel, al considerarse un combustible fósil derivado del petróleo crudo, se considera como uno de los principales causantes del calentamiento atmosférico y del cambio climático global por la emisión de CO₂ y otros gases de efecto invernadero. Los componentes fundamentales de este combustible son las parafinas y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH, por sus siglas en inglés *Polycyclic aromatic hydrocarbon*), además pueden contener compuestos metálicos, como azufre o nitrógeno.

En consecuencia, desde 1970 se han utilizado como alternativas biocombustibles como el biodiésel, un compuesto de monoalquil-ésteres de ácidos grasos de cadena larga, derivados de aceites vegetales o grasas animales, llamado B100. Un monoalquil-éster es el producto de una reacción entre un alcohol (etanol o metanol) de cadena lineal y una grasa animal o aceite vegetal (triglicérido), para formar glicerol (glicerina) y ésteres de ácidos grasos de cadena larga (Van Gerpen, 2004). Algunos estudios han demostrado que el biodiésel se degrada en menos tiempo que el diésel (Pasqualino et al., 2006; Prince et al., 2008) y produce menos gases de efecto invernadero (Lee et al., 2004; Balat & Balat, 2010). Además, se debe mencionar que el primero se utiliza para formular una gama de mezclas, de las cuales la más utilizada es la B20 (constituida por 20% de biodiésel y 80% de diésel). Esta combinación se emplea en automotores (sin necesidad de cambiar la estructura mecánica de los vehículos) y se considera menos tóxica que el diésel. Cabe mencionar que existen pocos estudios que evalúen los efectos tóxicos de dichos biocombustibles sobre los ecosistemas (Khan et al., 2007), por tanto se desconoce el potencial de riesgo ecológico que puede existir por la liberación de estos en el ambiente.

Se han implementado bioensayos para evaluar el daño que provocan los tóxicos vertidos en el ambiente sobre los organismos. Para calcular esos efectos, los ensayos pueden ser de dos tipos: letales o agudos (i. e., evalúan la concentración tóxica que causa la muerte de 50% de los organismos de prueba o el porcentaje de supervivencia) y subletales o crónicos (i. e., miden efectos que no implican la muerte de los organismos de ensayo). Es decir; con estas pruebas se analizan las secuelas que uno o más contaminantes (sean sustancias químicas conocidas o muestras ambientales de composición incierta) generan a los organismos como consecuencia de la exposición, durante un periodo determinado. Dichos efectos incluyen cambios fisiológicos o morfológicos en los organismos evaluados, por mencionar algunos. Para realizar estos ensayos se utilizan organismos que se consideran bioindicadores, es decir, especies o grupos taxonómicos capaces de reflejar el estado de conservación del medio donde viven (Blaustein, 1994; Blaustein & Wake, 1995).

Los anfibios se consideran organismos bioindicadores, debido a que pertenecen al grupo de los tetrápodos, los cuales se han considerado durante muchos años como una de las clases de vertebrados más susceptible a la contaminación química (Sima-A. et al., 2001).

Cuando las comunidades de anfibios presentan cambios poblacionales (escasez o abundancia de individuos), es posible sospechar la presencia de xenobióticos en el ambiente (Rueda-Almonacid, 2000). El potencial de estos animales como bioindicadores se debe a su doble ciclo vital, puesto que son los únicos organismos que durante su primera fase de desarrollo (estado larvario) presentan una vida acuática, y durante la etapa adulta (ranas) son capaces de vivir en el ambiente terrestre.

Durante el estadio temprano de desarrollo de estos renacuajos, comienza la formación de los órganos (sus sistemas, el digestivo, el respiratorio y el circulatorio). En consecuencia, estos organismos se vuelven más susceptibles a los efectos de la contaminación química debido a que dichos órganos quedan expuestos a una fácil absorción y acumulación en ellos, de muchos de los productos tóxicos disueltos en el agua. Además, los xenobióticos son también absorbidos por la piel, es por ello que estos individuos no pueden eludir el contacto directo con los contaminantes presentes en su hábitat.

Los animales en etapa larvaria suelen ser más sensibles a la contaminación del agua que los embriones (Berrill et al., 1994; Marco, 2002). Esto se debe a que la matriz gelatinosa que envuelve los huevos de la mayoría de los anfibios protege a los embriones de diferentes amenazas naturales (Waldman & Ryan, 1983; Ward & Sexton, 1981; Marco & Blastein, 1998). Dicha barrera es capaz de evitar la entrada de contaminantes a la membrana perivitelina. Hay evidencias de la alta sensibilidad de larvas de anfibios a muchas sustancias químicas que contaminan hábitats acuáticos y a alteraciones de la calidad del agua, como la acidificación o la eutrofización (Freda, 1986; Pierce, 1985). En la segunda etapa, la adulta, la absorción de contaminantes ocurre sobre todo por ingestión de alimento contaminado. Las sustancias tóxicas se acumulan en diversos órganos y tejidos de los anfibios (Canton & Slooff, 1982; Hall, 1990; Hall & Kolbe, 1980; Nebeker et al., 1995), lo cual puede tener diferentes efectos letales o subletales, como alteraciones funcionales, conductuales o del desarrollo, trastornos de la pigmentación y malformaciones (Bantle et al., 1991; Devillers & Exbrayat, 1992; Ouellet, 2001).

Es por ello que algunos anfibios y otros organismos se han extinguido o están en riesgo de desaparecer, lo que conlleva a alteraciones en los ecosistemas. Sin embargo, los daños o las malformaciones que ocurren a causa de la exposición a diversos xenobióticos, en

ocasiones no son apreciables a simple vista. Por esta razón se emplean biomarcadores, que son herramientas útiles en los estudios de evaluación de riesgo toxicológico, debido a su capacidad para estimar el daño temprano a través de cambios fisiológicos, bioquímicos, celulares, histológicos y de comportamiento en diferentes especies. Esta valoración se puede realizar en diferentes niveles de organización (Gold-Bouchot & Zapata-Pérez, 2004), a saber:

- Bioquímico y molecular (efectos en enzimas, proteínas, ADN, ARNm, etc.).
- Celular (cambios o daños en la membrana)
- Histológico (efectos en órganos y tejidos)
- Individual (efectos en el crecimiento)
- Poblacional (cambios en la reproducción)
- Comunitario (cambios en la diversidad).

Los biomarcadores se dividen en tres categorías fundamentales:

- a) Biomarcadores de exposición: permiten la detección y la medición de compuestos químicos y sus metabolitos, el producto de la interacción entre un agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del ambiente que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula diana.
- b) Biomarcadores de efecto: miden respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas u otras modificaciones en los tejidos o los fluidos, que pueden ser reconocidas y relacionadas con posibles alteraciones en el estado de salud de los organismos.
- c) Biomarcadores de susceptibilidad: indican la capacidad heredada o adquirida de un organismo para que puedan responder a cambios provocados por un xenobiótico específico (Van der Oost *et al.*, 2003; NRC, 1987).

Con el uso de biomarcadores se busca desarrollar técnicas químicas, bioquímicas y moleculares que sean rápidas, fáciles de determinar y sobre todo de bajo costo (Gold-Bouchot & Zapata-Pérez, 2004).

La evaluación de biomarcadores de diferente nivel de organización (que van desde la célula hasta los ecosistemas) permite obtener una visión holística de los efectos de tóxicos. La evaluación de estrés metabólico es un biomarcador de efecto a nivel fisiológico; se mide a través de la relación que hay entre el oxígeno y el nitrógeno (O:N) y proporciona información

sobre la energía que gasta el organismo en relación al sustrato a partir de la cual se genera (Mayzaud & Conover, 1988).

La actividad de la catalasa es un biomarcador de nivel bioquímico que indica la presencia de estrés oxidativo. Éste ocurre cuando hay un desequilibrio entre la producción de radicales libres o agentes prooxidantes y la capacidad antioxidante de un organismo. Se interpreta como el desbalance entre la producción de especies oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) y su eliminación, por la incapacidad compensatoria de los sistemas de defensa antioxidante (Livingstone, 2003; Ahmed, 2005).

Si bien existen estudios sobre los daños toxicológicos del diésel, es importante resaltar que aquellos que se enfocan en la toxicidad de los biocombustibles, como el biodiésel y sus mezclas, son escasos (Khan et al., 2007) y por lo tanto no se conoce el posible riesgo ecológico que implica su presencia en el ambiente. Por lo anterior, es necesario realizar más estudios para determinar el riesgo que representaría el biodiésel en caso de un derrame accidental como consecuencia de su uso frecuente en automotores.

Capítulo 1

1. Antecedentes

1.1 Aparición del biodiésel

A finales del siglo XIX, el ingeniero alemán Rudolf Diesel (1858 - 1913) inventó el motor de combustión, una máquina que utilizaba como fuente de energía *fuel oil* (biodiésel), un combustible hecho a partir de aceite de maní. En ese momento no se le dio mayor importancia a los biocombustibles, debido a que se pensaba que los combustibles fósiles eran inagotables, además de que no eran costosos. En 1912, Rudolf Diesel mencionó en un discurso que “el uso de aceites vegetales como combustibles de motor (biodiésel) puede parecer insignificante hoy; sin embargo, con el transcurso del tiempo, el uso de tales aceites puede convertirse en un combustible tan importante como el petróleo y los productos de alquitrán de hulla de la actualidad” (Kemp, 2006).

En 1970 surgió una crisis energética y se elevó el costo del petróleo, por lo que se popularizó de forma significativa el uso de biocombustibles como una alternativa para sustituir a los combustibles fósiles. Las primeras pruebas técnicas con biodiésel puro (B100) se llevaron a cabo en 1982 en Austria y Alemania, pero fue en 1985, en Silberberg (Austria), cuando se construyó la primera planta piloto productora de B100 a partir de aceite de canola (RME, por sus siglas en inglés *Rapeseed Methyl Ester*). Entre 2004 y 2005, el consumo de este biocombustible aumentó 50% en Estados Unidos. En 2006, la Secretaría de Energía (SENER) de México en conjunto con el Banco Interamericano de Desarrollo (BID) realizaron un estudio sobre las posibilidades y la viabilidad del uso de biocombustibles (el bioetanol y el biodiésel) para el transporte en México (Medina-Ramírez, et al., 2012).

En un estudio de la SENER (2006) se menciona que en México la producción de biocombustibles a escala comercial es factible, por lo que su elaboración ha incrementado y se

espera que en los próximos años sustituya de forma parcial, aunque significativa, el uso de biodiésel. La comercialización, el almacenaje y la transportación del biodiésel aumentan de manera importante la probabilidad de fugas o accidentes, lo cual, según la *Environmental Protection Agency*, se considera perjudicial para el ambiente. La ley que regula las fuentes de agua estableció que los aceites vegetales se consideran como petróleo en escenarios de derrames y contaminación (Bravo, 2007). Es por ello que se requiere de un esfuerzo importante en investigación y desarrollo.

1.2 Datos históricos e importancia ecológica de los anfibios

Durante muchos años, los anfibios se han considerado como el grupo más susceptible a la contaminación química, por lo que se usan como bioindicadores. La importancia de estos organismos en los ecosistemas se debe a que realizan una función reguladora; son el principal motor para la transformación de energía y nutrimentos acumulados en los insectos, debido a que ponen dichos nutrientes a disposición de los depredadores de niveles superiores dentro de la cadena alimenticia (serpientes, aves y mamíferos).

La transferencia energética de los anfibios en la cadena trófica es muy eficiente, debido a que ellos requieren de poco calor para vivir (son de sangre fría). Es por ello que el vigor que utilizan para mantener sus procesos fisiológicos emana de fuentes externas, como el sol. Para vivir requieren de temperaturas más bajas que las especies de sangre caliente y en consecuencia actúan como reservorio alimenticio dentro de los ecosistemas (Suazo-Orduño & Alvarado-Díaz, 2004).

1.3 Estudios que se han realizado con anfibios

Los anfibios se han utilizado en diversos estudios toxicológicos para la evaluación de cuencas hídricas, lixiviados, efluentes industriales y numerosos agentes físico-químicos solos o combinados, debido a su susceptibilidad a los contaminantes que se encuentran en el ambiente. Existen ensayos que se han realizado con otras especies de anfibios (tabla 1), sin embargo, con *Lithobates catesbeianus* son pocos los estudios toxicológicos que se han registrado. Actualmente la información con que se cuenta es referente a su mantenimiento y

su reproducción en cautiverio.

Tabla 1. Estudios ecotoxicológicos realizados en anfibios.

Autores	Año	Especie	Análisis realizados y hallazgos
Hopfer et al.	1991	<i>Xenopus laevis</i>	Evaluación de los efectos de diferentes concentraciones de NiCl ₂ en los estadios más tempranos del desarrollo embrionario, a través del método FETAX. Se concluyó que la CL ₅₀ de Ni ²⁺ fue de 365 ± 9 µmol/L (promedio más, menos desviación estándar (SD)). y la concentración que genero daños teratogénicos (EC ₅₀) fue 2.5 ± 0.1 (SD) µmol/L.
Rodríguez-Serna et al.	1998	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Se estableció que en los renacuajos de esta especie, la CL ₅₀ del NaCl varió desde un mínimo de 7.84 g/L durante 48 h hasta un máximo de 9.1 g/L para una exposición no mayor a 12 h.
Fordham et al.	2001	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Se determinaron efectos de supervivencia (2500 µg/L), crecimiento, desarrollo (1000 µg/L) y pérdida de postura de equilibrio (500-3000 µg/L) causados por intoxicación con malatión en renacuajos de esta especie.
Álvarez et al.	2001	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Se estudió que la concentración letal (CL _{50-96h}) del permanganato de potasio fue 1.22 mg/L, misma en la que se observaron efectos histopatológicos en estos renacuajos.
Sandoval et al.	2003	<i>Bufo arenarum.</i>	Se evaluó la toxicidad del malatión sobre embriones y larvas, se calculó la CL ₅₀ (22.2 mg/l) y se demostraron diversas afectaciones en la motilidad, retraso del desarrollo y algunas malformaciones.
Reyes et al.	2003	<i>Osteopilus septentrinalis</i>	Se determinó la CL ₅₀ del sulfato de cobre en larvas (estadio 25); una concentración de 2.1 mg Cu ²⁺ /L produjo una mortalidad de 100% en 19 de los 20 grupos tratados. Estos resultados fueron un criterio tomado en cuenta para la selección de una sustancia de referencia.
Gallo-Delgado et al.	2006	<i>Smillisca phaeota</i>	Se evaluó la toxicidad del insecticida clorpirifós en concentraciones subletales, en los estadios XXV - XXVI y en la metamorfosis (estadio 42). Se concluyó que este contaminante genera retraso en el desarrollo de la longitud de los organismos en etapas tempranas y en el desarrollo durante la metamorfosis.

Lascano et al.	2009	<i>Rhinella Arenarum</i>	Se valoró la toxicidad de dos tipos de plaguicidas organofosforados (OP), metilazinfós (MA) y clorpirifos (CP), y determinaron alteración teratogénica, además de estrés oxidativo.
Sztrum.	2010	<i>Rhinella Arenarum</i>	Se determinó que los organismos son más resistentes al níquel en las fases de desarrollo larvario que en la etapa embrionaria, en la cual se presentó una CL ₅₀₋₉₆ y 168 h de 0,19 (0,22 - 0,12) y 0,02 (0,03 - 0,01) mg Ni ²⁺ /L.
Muñoz-Escobar & Palacios-Baena	2010	<i>Dendrosopus bogerti</i>	Se estimaron los efectos del cloruro de mercurio (HgCl ₂), una CL ₅₀ (96 h) en una concentración de 0.41 mg/L; efectos en el crecimiento en 0.04, 0.08 y 0.1 mg/L de HgCl ₂ de los renacuajos.

Por otro lado, el interés de la presente investigación radica en la comparación toxicológica entre el diésel, el biodiésel puro (B100) y la mezcla (B20), para ello se han utilizado algunos organismos acuáticos como se muestra en la tabla 2. Cabe mencionar que si bien existe poca información, en la actualidad se realizan algunos estudios sobre este tema.

Tabla 2. Estudios relacionados con la toxicidad de combustibles (diésel, biodiésel y mezclas) en diversos organismos.

Autores	Año	Especies utilizadas	Análisis realizados
Khan et al.	2007	<i>Oncorhynchus mykiss</i> y <i>Daphnia magna</i>	Se estudiaron los efectos (inmovilidad y letalidad) de diferentes tipos de biodiésel (B100, B50, B20, B5 y diésel convencional). Se determinó que el biodiésel y sus mezclas son menos tóxicos que la mezcla B5 (5% biodiesel y 95% biodiésel) y el diésel.
Poon et al.	2007	<i>Sprague – Dawley</i>	Se evaluaron los efectos de la exposición a diésel con bajo contenido de azufre (LSD, <i>low sulfur diesel</i>) y a tres tipos de biodiésel (canola [C], soya [S] y de pescado [F]) sobre el hígado y la tiroides en machos de esta especie. Los resultados determinaron que los efectos fueron mayores en los organismos expuestos al LSD, y después en aquellos sometidos a Bio-S, Bio-C, Bio-F, en dicho orden, aunque todos mostraron daños en diferentes niveles (químicos, bioquímicos y adaptivos).

Nogueira et al.	2011	<i>(Oreochromis niloticus)</i>	Se estimaron los efectos de la exposición a diésel, biodiésel puro (B100) y a las mezclas B20 y B5, mediante biomarcadores bioquímicos de daño oxidativo. Se concluyó que hubo menos afectaciones por la exposición a la composición B20 que por contacto con la mezcla B5 y el diésel. Se sugiere tomar en cuenta el tiempo de exposición.
Nogueira et al.	2013	<i>Pterygoplichthys anisitsi</i> (Plecóstoma del Paraná)	Se evaluaron los efectos a corto plazo de diferentes mezclas de biocombustibles. Se demostró alteración de parámetros bioquímicos (estrés oxidativo) y se concluyó que el diésel es menos tóxico que el biodiésel y sus mezclas.
Cavalcante et al.	2014	<i>Danio rerio</i>	Se determinaron los efectos citotóxicos, bioquímicos y genotóxicos en la línea celular de los hepatocitos, por la exposición a la fracción soluble del biodiesel producido por dos rutas (etélica y metílica). Se concluyó que sin importar el tipo de producción, estos componentes generan estrés oxidativo y daños al ADN.

A pesar de que existen antecedentes descritos, es necesario obtener mayor información acerca de los daños que estos biocombustibles podrían causar a diversos organismos, considerando que su uso es cada vez mayor.

1.4 Organismo de estudio

Renacuajos de *Lithobates catesbeianus* (clase Anura, familia Ranidae, según Shaw, 1802), se han utilizado como bioindicadores en algunos estudios ecotoxicológicos (tabla 1). Se le da el nombre común de “rana toro” (bullfrog) (fig. 1).

En hábitats naturales, esta especie predomina en ambientes acuáticos; habita cuerpos de agua dulce (como pantanos, estanques, lagos o ríos de aguas poco profundas) e incluso puede tolerar agua salobre (Moyle, 1973). Prefiere cuerpos de agua con espesa vegetación acuática que le proporcione lugares convenientes para crecer y reproducirse y que además le permita escapar de depredadores (Díaz de Pascual & Chacón, 2002)



Figura 1. *Lithobates catesbeianus*, como organismo de prueba.

L. catesbeianus es una especie proveniente del este de Estados Unidos que se ha introducido a numerosos países del mundo, como Inglaterra, Italia, España, Portugal, Francia, Alemania, Austria, Japón, Israel, Malasia, Singapur, Rusia, Argentina, Paraguay, Perú, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Venezuela y Cuba (Bury & Whelan, 1985; Lannoo, 1995; Mazzoni, 1999; Rueda-Almonacid, 1999). Además se ha ampliado su distribución geográfica hacia el oeste de México.

En la actualidad, esta especie se cultiva en Yucatán, Querétaro y el Estado de México. Esto se atribuye a la importancia económica que ha adquirido, pues se utiliza para el consumo humano y su piel para confeccionar carteras y adornos (Díaz de Pascual & Chacón, 2002). Se ha tenido éxito en su reproducción, debido a que es estacional (comienza en la primavera y finaliza al inicio del verano), requiere de una temperatura ambiental de 25 a 30°C, una temperatura acuática de 20°C y ocurre en la época de lluvia (Xipe, 2013).

La facilidad con la que estos organismos se reproducen dificulta su control y por ello se le considera una especie invasora, además de que han originado graves daños a la biodiversidad de México.

1.5 Biomarcadores utilizados para la evaluación de efectos de diésel y biodiésel

En la evaluación de las posibles afectaciones que el diésel, el biodiésel y sus mezclas pueden causar a los organismos se han utilizado biomarcadores de efecto, como el estrés oxidativo, que es una respuesta a nivel bioquímico. Existen, sin embargo, otros

biomarcadores, como el estrés metabólico, que pueden proporcionar información sobre otros niveles jerárquicos o de organización (que van desde la célula hasta el ecosistema).

El estrés metabólico integra dos respuestas fisiológicas, la respiración y la excreción nitrogenada. Este biomarcador es una prueba no destructiva (se pueden realizar estudios secuenciales a un mismo individuo en sus diferentes etapas de desarrollo para observar efectos precisos); este tipo de prueba se ha aceptado, pues considera los aspectos éticos necesarios para la experimentación. Además este biomarcador se considera apto para fines de conservación de las especies (Depledge & Fossi, 1994).

Este biomarcador es importante pues a través de la evaluación de la excreción amoniacal se puede inferir la cantidad de componentes nitrogenados (proteínas) que el organismo pierde en un caso de estrés metabólico; esto se debe considerar, debido a que las proteínas desempeñan importantes funciones; entre ellas las de tipo estructural, facilitan la movilidad y actúan como reguladores en numerosos procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. Las proteínas contenidas en los tejidos viscerales, tales como el hígado y el intestino, representan aproximadamente el 10% del total corporal y no se moviliza en situaciones de estrés. Sin embargo, cabe mencionar que el número de estudios que se relacionan con el metabolismo de los anfibios en las fases embrionarias y larvales es mucho menor que el de ensayos en adultos tanto en anfibios como en otros grupos de vertebrados (Ultsch et al. 1999; Sztrum, 2010).

El estrés oxidativo como biomarcador proporciona información relacionada con las moléculas derivadas del oxígeno que tienen la capacidad de oxidar mediante reacciones en cadena, como el radical superóxido ($O_2^- \bullet$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH \bullet$) (Milena & González, 2008). En sistemas biológicos puede usarse para determinar efectos tóxicos inducidos por diferentes clases de contaminantes ambientales.

Las ROS (por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) pueden oxidar proteínas, lípidos (mediante peroxidación lipídica) y ácidos nucleicos. Además, son capaces de inactivar a las enzimas antioxidantes, lo cual daña al ácido desoxirribonucleico (ADN), altera la estructura de las células e incluso provoca muerte celular (Van der Oost et al. 2003; Atli & Canli, 2010).

En biología ambiental, los agentes reductores y los oxidantes que interactúan con los organismos suelen llamarse antioxidantes y pro-oxidantes (Kohen & Nyska. 2002). Cuando entran en desequilibrio se presenta estrés oxidativo. Los mecanismos celulares de defensa incluyen sistemas tanto enzimáticos como no enzimáticos, los cuáles se encargan de evitar la formación de radicales libres, capturar los que ya se han formado y remover o reparar las biomoléculas dañadas.

En las células sanas las ROS son eliminadas por los sistemas de defensa antioxidante, formados por enzimas y compuestos antioxidantes de bajo peso molecular, como la vitamina E, el ácido ascórbico, la enzima glutatión-peroxidasa (GSH) y otros tioles no proteínicos. Entre las enzimas, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) constituyen la primera línea de defensa antioxidante. La catalasa está relacionada con los peroxisomas, cuya función es desintoxicar a las células mediante la reducción de H_2O_2 a oxígeno molecular (O_2) y agua (H_2O) Esta reacción es útil para evaluar la presencia de estrés en plantas y animales, inducida por metales, plaguicidas y otros contaminantes (Li et al., 2006).

Como se aprecia en la tabla 2, se ha demostrado que tanto el diésel como el biodiésel generan estrés oxidativo y aunque se considera al segundo como un combustible más amigable con el ambiente comparado con el primero, es necesario comprobar si realmente afecta menos a los organismos acuáticos.

Capítulo 2

2. Pregunta de investigación e hipótesis

2.1 Pregunta de investigación

¿Los efectos del biodiésel (B100) y la mezcla B20 (20% diésel y 80% biodiésel) sobre *L. catesbeianus* son menos dañinos que los del diésel?

2.2 Hipótesis

Si el biodiésel B100 y la mezcla B20 se consideran combustibles alternativos para automotores debido a su menor impacto ambiental, entonces la exposición de renacuajos de rana toro a dichas sustancias debería tener efectos tóxicos menores que los causados por el diésel.

Capítulo 3

3. Objetivos

3.1 *Objetivo general*

Evaluar y comparar la toxicidad del diésel, el biodiésel (B100) y la mezcla (B20), utilizando renacuajos de rana toro *L. catesbeianus* (Shaw, 1802).

3.2 *Objetivos particulares*

- a) Determinar la CL_{50-96} de la fracción soluble del diésel, el biodiésel B100 y la mezcla B20.
- b) Evaluar los efectos toxicológicos de la FS de estos tres combustibles en renacuajos de *L. catabeianus*
- c) Determinar el efecto subletal del diésel, el biodiésel B100 y la mezcla B20 a través de la evaluación de biomarcadores: la razón O:N (estrés metabólico) y la actividad enzimática de la catalasa (estrés oxidativo).

Capítulo 4

4. Metodología

Este trabajo se basó en el modelo descrito en la figura 2. Inicialmente se garantizó que los organismos se mantuvieran en el laboratorio en condiciones adecuadas. Después se aseguró la obtención de las fracciones solubles de los combustibles y se montaron las técnicas de biomarcadores. La toxicidad de los combustibles se evaluó en dos bioensayos; el preliminar, que incluyó la evaluación de la toxicidad aguda (obtención de la CL_{50}), y el definitivo (evaluación de toxicidad por medio de biomarcadores), en el que se evaluaron efectos en concentraciones subletales. Ambos ensayos contaron con dos fases: la de exposición y la de depuración de los combustibles.

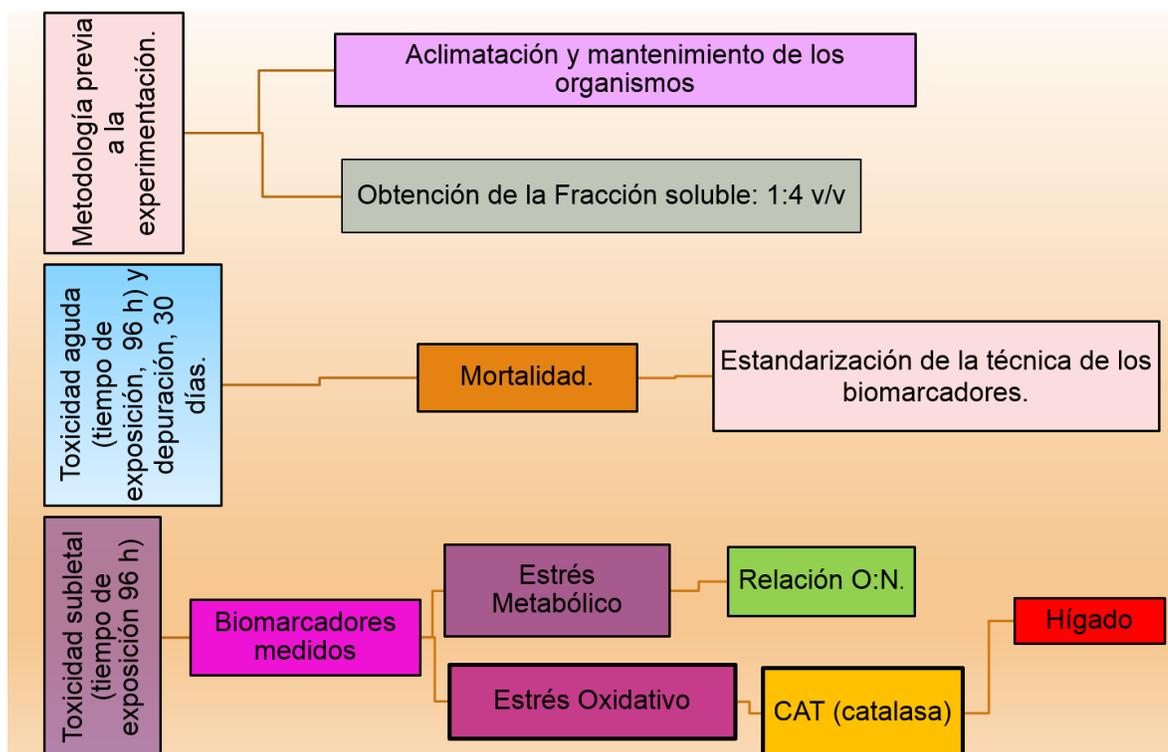


Figura 2. Modelo conceptual de la evaluación de los efectos de las fracciones solubles del diésel, el biodiésel (B100) y la mezcla B20 sobre *L. catesbeianus*

4.1 Recolección de organismos

Se colectaron renacuajos de *L. catesbeianus* en los estadios XX a XXV de desarrollo según (Gosner, 1960). Los organismos se eligieron de un estanque en particular de la granja de la comunidad de San Lorenzo, ubicada en Ciudad Hidalgo en el estado de Michoacán.

La colecta se realizó por medio de pequeñas redes en los meses de abril y julio de 2015; estos organismos provinieron de un sólo desove (tuvieron tallas semejantes de 3 cm de longitud o menos). Se registraron in situ el oxígeno disuelto (con un oxímetro YSI54A), la temperatura (con termómetro de cubeta) y el pH (con un potenciómetro Hanna modelo HI981).

Asimismo, se tomó una muestra de agua (200 ml) de la granja (en un recipiente de plástico de 250 ml), la cual se colocó en una hielera para su transporte al laboratorio. En seguida se le midió la dureza (mg/L de CaCO₃) con un titulador digital (Hach). Las características antes mencionadas sirvieron para la preparación del agua que se utilizó durante el mantenimiento en el laboratorio, para así tener un mejor control de los organismos y con ello, además, evitar un choque osmótico a los individuos.

Los renacuajos se trasladaron en una hielera con agua del estanque (con aireación por medio de bombas y una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) al laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM - I). Los organismos se instalaron en peceras de 35 L con agua limpia de la granja, donde permanecieron durante dos días.

Por otro lado, se preparó agua semidura que permaneció en aireación durante 24 h y se le ajustó el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto para que fuera similar al agua del sitio de colecta. Después de dos días, ésta agua se colocó en otras peceras de 35 L, donde se colocaron los organismos durante el periodo de mantenimiento y aclimatación. La temperatura del agua en este periodo fue de 18 a 21 °C, el pH fue de 7.5 a 8.3, el oxígeno disuelto de 5.0 a 6.0 mg/L. La dureza se mantuvo de 60 a 100 mg/L. Los organismos se revisaron antes de colocarlos en las peceras, para evitar incluir animales muertos o en mal estado.

4.2 Mantenimiento de los organismos en el laboratorio

Los organismos fueron colocados en peceras de 35 L previamente acondicionadas con un filtro de carbón y bombas de aireación. Se tomó en cuenta su tamaño para evitar eventos de canibalismo; es decir, renacuajos de un centímetro de longitud o menos se ubicaron en tanques diferentes a los animales con una talla mayor. La permanencia de estos especímenes fue de 15 a 30 días antes de exponerlos a los contaminantes (fig. 3).

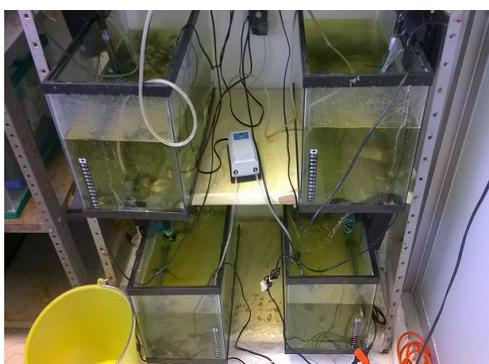


Figura 3. Peceras de 35 L con organismos en periodo de aclimatación y mantenimiento.

El registro de los parámetros fisicoquímicos y la limpieza de las peceras se realizaron diario. Cada tercer día se llevó a cabo un cambio parcial de agua (10 L). En la primera colecta (abril) se introdujeron entre 30 y 50 organismos en cada pecera y sólo 35 en la segunda (junio); los acuarios se instalaron en un lugar cerrado para evitar fluctuaciones de temperatura y facilitar el mantenimiento de las condiciones óptimas, como lo estipula la bibliografía (tabla 3).

*Tabla 3. Calidad del agua requerida para el mantenimiento de larvas.
(Xipe et al., 2013).*

Parámetro	Valor Óptimo
Temperatura (°C)	22.0 ± 2.0
pH	7.3
Fotoperíodo (horas de luz: oscuridad)	14:10
OD (mg/L)	6.4
Dureza Total (mg/L CaCO₃)	60.0

Los parámetros tomados en consideración para esta fase de la investigación como se ve en la tabla fueron el oxígeno disuelto (OD) y la dureza; misma que fue medida en miligramos por litro de carbonato de calcio (mg/L CaCO₃).

Los organismos se alimentaron con 0.045 g de hojuela molida para peces tropicales (*pellet* de camarón con vitaminas) cada tercer día, para ello se detenía el funcionamiento de las bombas de aireación y los filtros. Después de tres horas de la administración del alimento se realizaba la limpieza de las peceras, y se colocaban de nuevo el equipo para el mantenimiento de los organismos (las bombas de aireación y los filtros).

4.3 Obtención de la fracción soluble de los combustibles

El agua que se utilizó para obtener la fracción soluble (FS) de los contaminantes fue semidura (con 60 a 100 mg/L de CaCO₃) y fue la misma que se utilizó para el mantenimiento de los organismos y para las pruebas de la toxicidad aguda y la subletal (tabla 4).

Los contaminantes que se utilizaron en este estudio fueron diésel, biodiésel (B100) y mezcla (B20); el diésel se adquirió en una gasolinera de PEMEX, el B100 fue donado, o y se obtuvo a partir de aceites vegetales reciclados mediante el método “*Batchprocessing*” (Van Gerpen, 2004).

La mezcla B20 se produjo de la combinación de los combustibles que se mencionaron con anterioridad, en una proporción de 80% diésel y 20% biodiésel.

Para obtener las FS utilizadas en los bioensayos, se agregó agua (reconstituida) al combustible correspondiente en una relación 1:4 (v/v) (fig. 4). Cada disolución se colocó en un recipiente de vidrio de un litro de capacidad, se mantuvo en agitación constante (con agitadores magnéticos sobre planchas de agitación) durante 24 horas a temperatura ambiente y después se dejó reposar durante una hora. La mezcla se recolectó con un sifón a través de un sistema de vacío para eliminar cualquier remanente de la fase densa. Se separó la fracción acuosa y esta se utilizó como solución patrón (100% v/v), a partir de la cual se obtuvieron las FS que se manejaron en este estudio (Anderson *et al.*, 1974).



Figura 4. Obtención de la fracción soluble (FS) de los tres contaminantes que se utilizaron.

4.4 Métodos utilizados en las dos fases experimentales

Durante las dos fases experimentales (aguda y subletal) de este trabajo se registraron diario las variaciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Esto se realizó tanto en los acuarios como en los dispositivos experimentales; para ello se utilizó un potenciómetro Hanna y un oxímetro YSI54A. Ambos bioensayos se llevaron a cabo en agua dulce semidura (60-100 mg/L de CaCO₃) a una temperatura de 22 ± 2°C, condiciones similares a las de las piletas de la granja de San Lorenzo (lugar de colecta). La duración del periodo experimental fue de 96 h, en ambos fases. Asimismo, los ejemplares permanecieron un mes en las cámaras de recuperación. Se llevaron a cabo recambios parciales de la mitad del volumen de agua de los dispositivos cada 48 h, tanto en la fase de exposición como en la de recuperación.

Los organismos se seleccionaron al azar para colocarlos en las cámaras con las condiciones que se detallan a continuación para cada ensayo (fig. 5). Al retirar a los organismos de los dispositivos experimentales se registraron los parámetros morfométricos (longitud, peso y anchura) con una regla y una balanza digital (Ohaus Analytical Plus).



Figura 5. Montaje del experimento.

4.5. Evaluación de la toxicidad aguda (prueba preliminar)

4.5.1 Fase de exposición (96 h)

Se utilizó un sistema estático de 48 cámaras experimentales con capacidad de 1920 ml, en las cuales se colocaron las FS (fracciones solubles) de cada contaminante. Se incrementaron las concentraciones de forma geométrica (Diechman & Mergara, 1948). Las concentraciones utilizadas fueron 0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 y 1.00% de las FS de cada combustible, cada una de las cuales incluyó tres réplicas.

En cada cámara se colocaron cinco organismos (un total de 15 individuos por cada condición experimental). Se utilizaron en total 240 animales en el ensayo. Las observaciones realizadas durante esta prueba se registraron a los 60 minutos, después a las tres, seis, 12, 24,

48, 72 y 96 h. Después de las 96 h se dio por concluida esta fase y se determinó la CL_{50-96h} de los organismos expuestos con el método Probit, usando el programa *EPA Probit Analysis program used for calculating LC/EC values version 1.5*.

Se midieron y evaluaron los parámetros fisicoquímicos de los dispositivos experimentales a diario.

4.5.2 Fase de depuración

Al finalizar la fase de exposición, y después de cinco días de observación, se decidió colocar a todos los animales expuestos a un tipo de contaminante en peceras de 35 L con agua limpia. Esta etapa duró 31 días y se registró la muerte de los organismos de manera periódica. Al final este lapso se sacrificaron cinco renacuajos para la estandarización de las técnicas de los biomarcadores, estrés metabólico y estrés oxidativo (para esta última se les extrajo el hígado con un equipo de disección).

4.6 Evaluación de los renacuajos en la prueba subletal (prueba definitiva)

A partir de los resultados obtenidos en la prueba preliminar, se seleccionaron las concentraciones de exposición a las que se sometieron los organismos, las cuales fueron 0.06 y 0.12%.

4.6.1 Fase de exposición

Se utilizó un sistema estático de 21 cámaras experimentales de 3780 ml, en las cuales se colocaron 12 organismos. Las pruebas se hicieron por triplicado para las dos concentraciones de los tres combustibles y el control, utilizándose 36 renacuajos por concentración, 246 en todo el bioensayo (tabla 4). Esta fase también duró 96 h; el análisis de biomarcadores se realizó en cinco de los organismos en los días uno, dos y cuatro. Los animales no fueron alimentados en esta etapa (tabla 4).

4.6.2 Fase de depuración

Durante este periodo, los organismos permanecieron en las mismas cámaras, con agua limpia. En esta fase los renacuajos persistieron durante un mes, lapso en el que los animales si fueron alimentados diariamente. El análisis de los biomarcadores se realizó con cinco organismos diferentes, esto fue los días 15 y 30 (tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental en la fase definitiva de exposición subletal.

Días de evaluación	Organismos Totales	Control es n = 30	FSD n = 72		FSB n = 72		FSM n = 72	
	Por contaminante							
	Por concentración de cada contaminante		30	0.06%	0.12%	0.06%	0.12%	0.06%
			36	36	36	36	36	36
1	Para la evaluación de los biomarcadores	5	5	5	5	5	5	5
2		5	5	5	5	5	5	5
4		5	5	5	5	5	5	5
15		5	5	5	5	5	5	5
30		5	5	5	5	5	5	5

En esta tabla se observa el número de organismos (n) que fueron utilizados para evaluar la toxicidad de cada uno de los contaminantes, fracción soluble de diésel (FSD), fracción soluble del biodiésel (FSB) y fracción soluble de la mezcla (FSM). Esta evaluación se realizó en diferentes días.

Estrés metabólico a través de la relación O:N

Se determinó la razón O:N con base en la técnica propuesta por Maizaud y Conover (1988), modificada por Barrera-Escorcía (2006). Para ello se midieron primero tanto el consumo de oxígeno como la excreción nitrogenada. Ambos se calcularon en cámaras individuales, las cuales se prepararon de la siguiente manera (fig. 6).

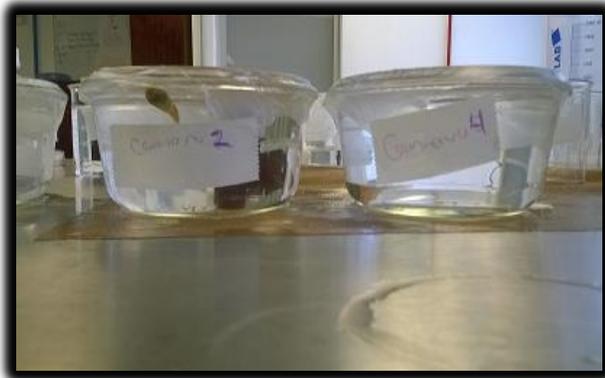


Figura 6. Montaje de la prueba de estrés metabólico.

Se preparó agua con las características indicadas en la tabla 1 y se aireó durante una hora. Con ésta se llenaron cámaras de 270 ml en las cuales se colocaron los organismos individualmente. Las cámaras se cerraron de forma hermética durante seis horas, evitando la presencia de burbujas de aire y el oxígeno se midió con un oxímetro YSI54A. El cálculo de la respiración se obtuvo de manera individual por la diferencia observada entre las concentraciones final (OD_f) e inicial (OD_i) (formula 1). Al resultado obtenido se le restó el consumo de las cámaras sin organismos, como se muestra en la fórmula 2.

Cálculo de la respiración como consumo de oxígeno por individuo.

$$\text{Fórmula 1: } VO \text{ (mg/h * individuo)} = \frac{[OD]_f - [OD]_i}{t \text{ (h)}} * \text{vol de la cámara (L)}$$

VO= consumo de oxígeno
 OD= oxígeno disuelto (mg)
 t= tiempo
 h= horas
 vol= volumen

$$\text{Fórmula 2: } VO \text{ (mg/h * individuo)} - VO \text{ (mg/h) de las cámaras sin organismos.}$$

En el caso de la excreción nitrogenada, esta se calculó a partir de las lecturas de nitrógeno amoniacal obtenido siguiendo el método de Nessler, con un equipo HACH DREL 2010. La excreción se estableció a través de la diferencia de concentraciones final ($N-NH_{3f}$) e inicial ($N-NH_{3i}$) (formula 3). En este caso también se eliminó la producción de las cámaras sin organismos como se muestra en la fórmula 4.

Cálculo de la excreción nitrogenada por individuo.

$$\text{Fórmula 3: } \Delta\text{N-NH}_3 \text{ (mg/h * individuo)} = \frac{[\text{N-NH}_3] \text{ f} - [\text{N-NH}_3] \text{ i}}{t \text{ (h)}} * \text{vol. de la cámara (L)}$$

ΔN = excreción nitrogenada
 N-NH_3 = nitrógeno amoniacal (mg)
 t = tiempo
 h = horas
 vol = volumen

$$\text{Fórmula 4: } \Delta\text{N-NH}_3 \text{ (mg/h * individuo)} - \Delta\text{N-NH}_3 \text{ (mg/h) de las cámaras sin organismos}$$

Al término de la prueba se obtuvieron los datos morfométricos (longitud, ancho y peso) de los individuos. Posteriormente, estos renacuajos se sometieron a la técnica de adormecimiento a (-4°C) baja temperatura durante dos horas, y se sacrificaron con una herramienta punzocortante. Después se les extrajo el hígado para el estudio del estrés oxidativo. A continuación se introdujo solo el tejido sobrante de estos animales en un crisol y en la estufa (*Felisa Mod. 131*) a 60°C durante 48 h. Posteriormente se obtuvo el peso seco del tejido de los organismos. Al tener estos datos se logró conocer el consumo de oxígeno por gramo de peso seco (fórmula 5).

$$\text{Fórmula 5: } \text{VO (mg/h * individuo)}/\text{PS} = \text{VO mg/h} * \text{gPS}$$

VO = consumo de oxígeno
 PS = peso seco del organismo.

En el caso de la excreción nitrogenada también se utilizaron los datos del peso seco de los organismos con el fin de obtener los valores estandarizados (fórmula 6).

$$\text{Fórmula 6: } \Delta\text{N-NH}_3 \text{ (mg/h * individuo)}/\text{PS} = \Delta\text{N-NH}_3 \text{ (mg/h} * \text{gPS)}$$

$\Delta\text{N-NH}_3$ = excreción nitrogenada
 PS = peso seco del organismo.

Por último, se determinó la razón O:N a través de las fórmulas 7, 8 y 9).

$$\text{Fórmula 7: } \text{O} = \text{VO mg/h} * \text{gPS}/16$$

16 = peso atómico del oxígeno

$$\text{Fórmula 8: } N = \Delta N\text{-NH}_3 \text{ (mg/h} \cdot \text{gPS)} \cdot (0.8235) / 14$$

14 = peso molecular del nitrógeno

0.8235 = porcentaje de nitrógeno en la molécula NH_3

$$\text{Fórmula 9: } O:N = O/N$$

Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas se determinó conforme al experimento de proteínas de azul brillante de Coomassie, conocido como ensayo de Bradford (1976), adaptado a microplaca (Hebert, 1995) con modificaciones.

Se homogeneizó un gramo de tejido en 10 ml de solución Tritón X-100 al 1% (p/v). Se utilizó un filtro S 0.45 para extraer el sobrenadante y se conservó a -4°C para su análisis posterior. Se empleó el reactivo Bradford (Coomasie G - 250) marca Bio-Rad (como solución de reacción) en una proporción 1:4 con agua destilada y albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*) como estándar. Se utilizaron 10 μl de cada muestra por cuadruplicado y 200 μl de colorante (Bradford) y se midió la absorbancia en una longitud de onda de 630 nm en un lector de Elisa de la marca Biotek ELx808.

Estrés oxidativo a través de la actividad enzimática de la catalasa

Se evaluó la actividad enzimática de la catalasa según el método de Cohen *et al.* (1970). En este procedimiento, el hígado previamente extraído y triturado se colocó en un tubo de ensayo con cinco mililitros de H_2O_2 6.00 mM frío (se agitó en un vórtex). Al tejido homogeneizado después de tres minutos se le agregó un mililitro de ácido sulfúrico 6.00 N (para detener la reacción) y siete mililitros de permanganato de potasio (KMnO_4) 0.01 N (se agitó otra vez). Se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 480 nm con un espectrofotómetro Spectronic 21D. Para el registro de resultados se cuantificó la cantidad de proteínas del tejido (hígado), como se mencionó con anterioridad. Los resultados de estrés oxidativo se expresaron en U/mg de proteína (1 μmol de H_2O_2 por mg de proteína).

Análisis estadísticos.

El análisis estadístico de todos los datos se llevó a cabo con los programas Statistica y NCSS11. Con el programa Statistica se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov, para conocer si los datos se ajustaban a una distribución normal. Por otro lado, con el programa NCSS se realizó la prueba de homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En los datos que cumplieron con éstos supuestos, se utilizó una prueba paramétrica (Anova, F) y para los que no cumplieron con estos supuestos, se utilizó una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis, H). Por último se realizó un análisis de correlación, para conocer de manera cuantitativa el grado y la dirección de la relación que existe entre dos variables. La evaluación del coeficiente de correlación que se utilizó dependió del tipo de distribución de la población, para datos normales se utilizó la correlación de Pearson y para los datos no paramétricos se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Capítulo 5

5. Resultados y discusión

5.1 Colecta de organismos

Los resultados de los parámetros obtenidos en el sitio de colecta se muestran en la tabla 5. Estos valores promedio se obtuvieron de tres estanques diferentes, donde se encontraban organismos de la misma puesta. Cabe mencionar que estos organismos (renacuajos y ranas adultas) se encontraban a temperatura ambiente, sin embargo, se ubicaban dentro de una nave acuícola (para su producción y mantenimiento). El pH y el OD se mantienen en niveles similares en los tres estanques. En este ranario se realiza un cambio parcial de agua cada semana y la limpieza se hace cada tercer día, a lo cual se le podría atribuir la similitud en los valores de los parámetros fisicoquímicos.

Temperatura (°C)	24.0 ± 1.0
pH	7.5 ± 2.0
OD (mg/L)	4.5 ± 0.1

El Oxígeno disuelto (OD) se registró en miligramos por litro (mg/L)

5.2 Mantenimiento de los organismos en el laboratorio

Los valores de los parámetros fisicoquímicos del agua registrados durante el mantenimiento de los organismos en el laboratorio se ajustaron a los recomendados por Xipe, (2013), no obstante, algunos de ellos no fueron similares, como el fotoperiodo, el pH y el OD (tabla 6). En la bibliografía se propone un mayor tiempo de exposición a luz, lo cual en este estudio no fue posible cumplir debido a las condiciones del laboratorio. En el caso del pH, los

datos registrados fueron mayores y en cuanto al oxígeno disuelto, se obtuvieron valores menores que los recomendados.

A pesar de estas variaciones, los organismos no se vieron afectados, pues no se observó mortandad durante esta etapa (mantenimiento). Esto se puede deber a que si bien las condiciones fisicoquímicas obtenidas en este estudio no fueron similares a las recomendadas por la bibliografía, si fueron semejantes (en el caso del pH) a las registradas en el lugar de colecta (ranario). Por otra parte, los valores de oxígeno disuelto del agua de los organismos si variaron, pues los registrados en este estudio fueron mayores que los del hábitat inicial, sin embargo, no se les adjudica ningún daño (tablas 5 y 6).

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos para el mantenimiento de los organismos.

Parámetros	Valores óptimos (Xipe, 2013)	Parámetros registrados en el laboratorio.
Temperatura (°C)	20.0 ± 2.0	18.0 – 21.0
pH	7.3	7.5-8.3
Fotoperiodo: horas de luz: oscuridad	14:10	12:12
OD (mg/L)	6.4	5.0-6.0
Dureza total (mg/L de CaCO₃)	60.0	60-100

Oxígeno disuelto (OD) en miligramos por litro (mg/L. Dureza en miligramos por litro de carbonato de calcio (mg/L de CaCO₃).

5.3 Prueba preliminar (evaluación de la toxicidad aguda)

En el análisis de los datos de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en este estudio, se determinó que no presentaron normalidad por lo que se realizó un análisis no paramétrico (Kruskal–Wallis, H). Los resultados se detallan a continuación.

Parámetros fisicoquímicos

Los valores de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH y OD) obtenidos en la evaluación de la toxicidad aguda (tabla 7) demostraron similitud entre las tres réplicas, tanto de los controles como de cada una de las concentraciones de los combustibles (0.06, 0.12,

0.25, 0.50 y 1.0%). Sin embargo, al ser comparados los valores registrados en el agua de las cámaras de los organismos control con la de los expuestos, se obtuvieron diferencias significativas en dos de los parámetros, el pH y el OD.

En el caso del pH, el agua de las cámaras control demostraron un valor promedio mayor (8.0 ± 0.2) en comparación con la que se encontraba en las cámaras con todas las concentraciones del diésel (7.90 ± 0.2) ($p < 0.05$). En la evaluación del biodiésel, las diferencias sólo se registraron en el agua con las concentraciones más altas (0.25, 0.5 y 1.0%); el promedio de estas fue 7.8 ± 2.0 . No se registraron diferencias en ninguna concentración de la mezcla 7.9 ± 2.3 (tabla 7).

Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos registrados en las pruebas de toxicidad aguda (promedio \pm desviación estándar).

	Concentraciones (%)	Control	diésel	biodiésel	mezcla
Temperatura (°C)	0	20.9 ± 1.3	-	-	-
	0.06	-	20.8 ± 1.5	20.8 ± 1.7	20.7 ± 1.4
	0.12	-	20.6 ± 1.5	20.8 ± 1.4	20.7 ± 1.3
	0.25	-	21.0 ± 1.1	20.9 ± 1.2	20.8 ± 1.0
	0.5	-	20.9 ± 1.1	20.8 ± 1.2	21.0 ± 1.0
	1	-	21.1 ± 1.0	21.1 ± 1.1	21.2 ± 1.0
	pH	0	8.1 ± 0.2	-	-
0.06		-	7.9 ± 0.2 *	7.9 ± 0.2 *	8.0 ± 0.1
0.12		-	7.9 ± 0.1 *	7.9 ± 0.2 *	7.9 ± 0.1
0.25		-	7.9 ± 0.2 *	7.8 ± 0.2 *	7.9 ± 0.2
0.5		-	7.9 ± 0.1 *	7.8 ± 0.2 *	7.9 ± 0.2
1		-	7.9 ± 0.1 *	7.7 ± 0.2 *	7.9 ± 0.2
OD (mg/L)	0	2.8 ± 1.4	-	-	-
	0.06		2.5 ± 0.9	2.8 ± 1.3	2.8 ± 1.2
	0.125	-	2.3 ± 0.7	2.7 ± 1.2	2.4 ± 0.27
	0.25	-	2.4 ± 0.8	2.3 ± 0.9	2.3 ± 1.1
	0.5	-	2.5 ± 0.9	1.9 ± 0.8	2.0 ± 1.0
	1	-	2.6 ± 0.9	1.6 ± 0.9	1.8 ± 1.1 *

**Diferencias con respecto a las cámaras de los organismos control ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). El oxígeno disuelto (OD) se registra en miligramos por litro (mg/L).*

Los valores de OD en general fueron bajos, sin embargo, en el análisis estadístico se mostró una diferencia significativa entre el OD contenido en el agua de las cámaras de los organismos control con respecto a los individuos expuestos a la fracción soluble de la mezcla al 1.0% ($p < 0.05$, $H = 17.03$); el valor promedio del agua del control fue 2.8 ± 1.4 mg/L, mientras que el de la mezcla fue de 1.8 ± 1.1 (tabla 7).

El valor promedio de las demás concentraciones de la mezcla B20 sin incluir la concentración 0.1% fue de 2.3 ± 1.2 mg/L. Cabe mencionar que las condiciones de aireación fueron las mismas tanto en el agua de las cámaras de los organismos control como en la de expuestos, por lo que la diferencia registrada se debe a la presencia de la mezcla B20 a la que los animales estuvieron expuestos.

La mortalidad registrada en la prueba de toxicidad aguda (fases de exposición y recuperación) se detalla a continuación.

Mortalidad en la fase de exposición (96 h)

Los resultados obtenidos durante esta fase experimental demostraron que en las concentraciones más altas de diésel (0.50 y 1.0%) se presentó mortalidad, obteniendo un total del 19 %, siendo baja en comparación con la que se notificó en las diferentes concentraciones de la mezcla B20 (excepto en la fracción soluble 0.12%, en la cual no hubo descensos), pues la mortandad acumulada fue del 31%. La exposición al biodiésel (en todas las concentraciones), generó el mayor descenso con 44% del total con respecto a los otros dos combustibles, como se puede observar en la tabla 8.

En esta tabla se puede observar que la tasa de mortalidad de los renacuajos del grupo control fue cero, mientras que en los animales expuestos a las FS varió de cero a 13 por ciento únicamente. Solo en el caso del diésel se pudo observar un aumento de la mortalidad asociado al aumento de la concentración. En el caso del biodiésel y la mezcla, las concentraciones utilizadas causaron un número de organismos muertos similar en todas las concentraciones, lo que dificultó el cálculo de la CL_{50-96h} .

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de los organismos durante la fase de exposición aguda (96 h).

Concentraciones de las FS	controles	Diésel	biodiésel	mezcla
0.06	0	0	13	6
0.12	0	0	6	0
0.25	0	0	13	6
0.50	0	6	6	13
1.00	0	13	6	6
Total de organismos muertos en porcentajes %	0	19	44	31

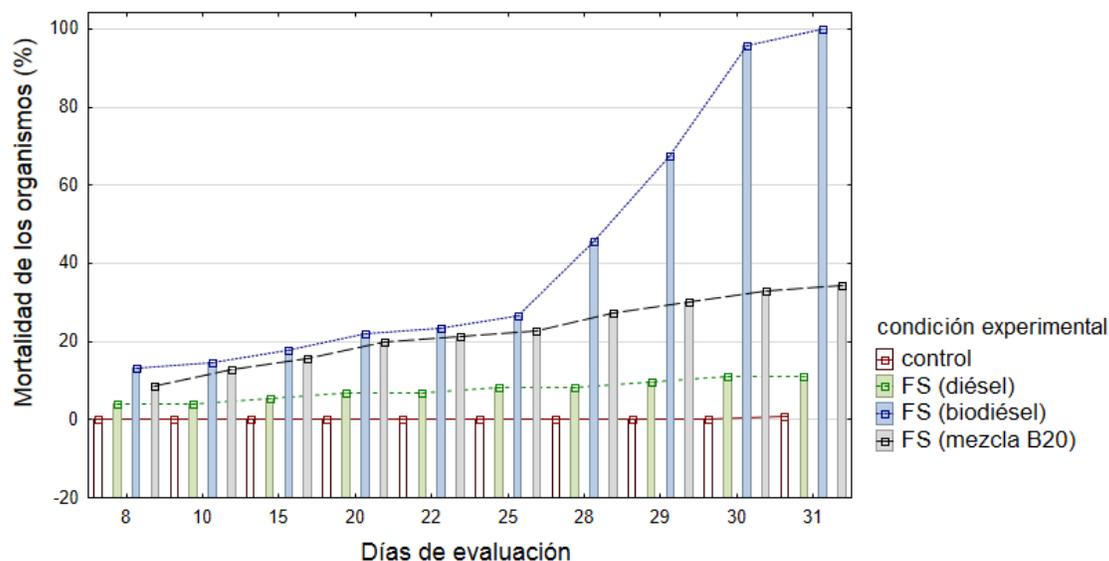
Se utilizaron las Fracciones solubles (FS), para someter a los organismos al bioensayo.

Sin embargo, la mortalidad de los renacuajos expuestos al diésel permitió calcular una CL_{50-96h} de 2.85% de la FS y una CL_{1-96h} de 0.27%, lo que favoreció para elegir la concentración subletal para la siguiente fase experimental (prueba subletal). Para calcular una CL_{50-96h} del biodiésel y de la mezcla B20 sería necesario incrementar las concentraciones de exposición.

Mortalidad en la fase de recuperación

Los organismos sobrevivientes de la fase aguda fueron conservados en agua sin contaminantes durante 31 días, debido a que los resultados de mortandad entre las diferentes concentraciones no fueron claros.

Cabe mencionar que al principio no se planteó una etapa de recuperación, por lo que se juntaron de acuerdo al tipo de combustible todos los lotes de las diferentes concentraciones en una sola cámara. Debido a ello, la mortalidad que se registró más adelante se asoció sólo al combustible al que estuvieron expuestos (fig. 7).



En esta gráfica se modela la mortalidad en porcentaje de los organismos en cada una de las fracciones solubles (FS) de los combustibles.

Figura 7. Mortalidad acumulada en la fase de depuración (31 días).

En dicha figura se observa una mayor tasa de mortandad en los animales expuestos a los tres combustibles a partir del día 28.

Al término de este periodo (día 31) los porcentajes de mortalidad acumulada fueron los siguientes: en las cámaras de los organismos control se registró sólo 1%, en los animales expuestos a la concentraciones de la fracciones solubles del diésel (FSD) la mortalidad fue 11%, en el caso de los renacuajos colocados en los dispositivos de las fracciones de la mezcla (FSM) se obtuvo un 34%. Por otro lado, en las cámaras de las concentraciones del biodiésel (FSB) se registró el 100% de especímenes muertos. Fue evidente que los organismos no se observaron severamente afectados durante la exposición de 96h y que la mortalidad se presentó después aún en ausencia de los combustibles, por lo que el análisis de los daños asociados a estos debería también realizarse después de la exposición para determinar con la mayor exactitud el posible daño que pudiesen generar a los especímenes.

Debido a esta mortalidad se analizó la fisonomía del hígado de los individuos. El hígado de los organismos control mostró una estructura definida y con una tonalidad rojiza

(fig. 8a). El órgano de los renacuajos expuestos a la FSB presentaron una coloración rojiza similar, sin embargo, al revisarlo con profundidad se observó una porción de color amarillo (similar al tejido adiposo) (fig. 8b). En otros ejemplares se percibió una tonalidad homogénea de color amarillo y pérdida de una estructura definida (fig. 8c). En ejemplares expuestos a los otros combustibles (diésel y la mezcla) el hígado adquirió un color negruzco y se perdió la morfología normal. Estos hallazgos evidenciaron daño por la exposición a los combustibles, que se generó aún después de terminar este periodo del bioensayo.

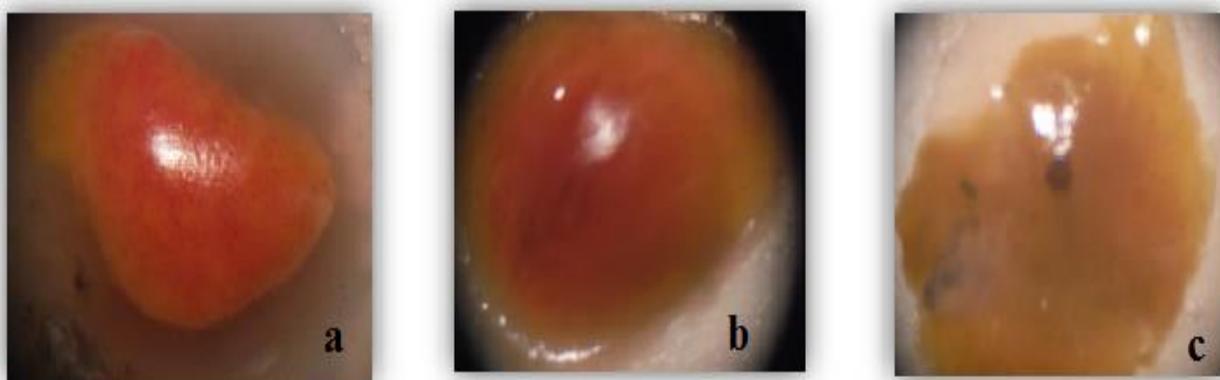


Figura 8. Hígados de organismos en el periodo de recuperación (después del periodo de exposición de 96 h a las fracciones solubles del biodiésel (FSB)); organismo control (sano) (a) organismo con poco daño (b); organismo con daño evidente (c).

5.4 Prueba de toxicidad definitiva (toxicidad subletal)

Parámetros fisicoquímicos de la fase de toxicidad subletal

Al realizar una evaluación general se demostraron similitudes de temperatura y oxígeno disuelto y diferencias significativas de pH en las diferentes condiciones experimentales. Los promedios obtenidos se aprecian en la tabla 9.

Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos del agua de las cámaras (promedio \pm desviación estándar).

Concentraciones	Control	FSD (0.06%)	FSD (0.12%)	FSB (0.06%)	FSB (0.12%)	FSM (0.06%)	FSM (0.12%)
Temperatura (°C)	21.1 \pm 1.3	21.2 \pm 1.8	21.2 \pm 1.4	21.3 \pm 1.8	21.3 \pm 1.4	21.0 \pm 1.7	21.4 \pm 1.3
pH	7.9 \pm 0.3	7.6 \pm 0.2	7.6 \pm 0.2	7.6 \pm 0.1	7.2 \pm 0.5 ^a	7.5 \pm 0.2	7.5 \pm 0.2
OD (mg/L)	6.3 \pm 0.3	5.9 \pm 0.5	5.9 \pm 0.6	6.2 \pm 0.2	5.9 \pm 0.4	6.2 \pm 0.3	5.6 \pm 1.1

^a *Diferencias con respecto a las cámaras de los organismos control (por Kruskal-Wallis). En esta tabla se observa que el oxígeno disuelto (OD) se registró en miligramos por litro (mg/L) y se evaluó en el agua de todas condiciones experimentales, como la fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiésel (FSB) y fracción soluble de la mezcla (FSM).*

El valor promedio de la temperatura del agua de todos los organismos fue de 21.0 \pm 1.4°C y la media del OD fue 6.10 \pm 0.53 mg/L. Se demostró únicamente una diferencia significativa en el pH del agua de las cámaras control con respecto a la de los organismos expuestos a la concentración 0.12% del biodiésel. Los promedios registrados fueron 7.9 \pm 0.3 en los controles y 7.2 \pm 0.5 en los contaminados (p <0.05). Esta diferencia se puede relacionar solo con el tipo de combustible que se utilizó, pues las condiciones iniciales fueron iguales para todas las cámaras de los individuos. .

Parámetros morfométricos.

Los promedios de los parámetros morfométricos (longitud, peso húmedo y anchura) de los organismos sometidos a la fase subletal se observan en la tabla 10. La evaluación de estas variables se realizó a todos los renacuajos en condiciones experimentales, debido a que en el análisis estadístico se demostró que no hubo diferencias significativas entre controles y expuestos (p >0.05), es decir; se demostró similitud entre ellos, por lo que se obtuvo un promedio general de cada uno de los parámetros evaluados. Los resultados fueron: en el peso húmedo 1.31 \pm 0.31 g, en la longitud fue 4.28 \pm 0.65 cm y en el ancho fue de 0.96 \pm 0.18 cm.

Tabla 10. Parámetros morfológicos (promedio ± desviación estándar).

Concentraciones	Controles	FSD (0.06%)	FSD (0.12%)	FSB (0.06%)	FSB (0.12%)	FSM (0.06%)	FSM (0.12%)
Peso húmedo (g)	1.24 ± 0.26	1.30 ± 0.36	1.19 ± 0.25	1.24 ± 0.21	1.37 ± 0.34	1.30 ± 0.31	1.36 ± 0.33
Longitud (cm)	4.34 ± 0.53	4.30 ± 0.70	4.14 ± 0.76	4.16 ± 0.74	4.25 ± 0.68	4.36 ± 0.34	4.34 ± 0.77
ancho (cm)	0.98 ± 0.16	0.92 ± 0.14	0.96 ± 0.18	0.96 ± 0.18	0.98 ± 0.20	0.97 ± 0.18	0.94 ± 0.22

En la tabla se observa las variaciones en las mediciones de los parámetros morfológicos de los organismos en todas las condiciones experimentales; Fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiésel (FSB) y fracción soluble de la mezcla (FSM).

Con el análisis estadístico también se demostró que los organismos de los lotes sometidos a bioensayo presentaban tallas similares, y los posibles cambios en estos parámetros se pueden vincular únicamente a la exposición de los combustibles.

5.5 Evaluación de biomarcadores

La evaluación de los biomarcadores se realizó en las dos fases del bioensayo subletal, es decir, durante las fases de exposición y de depuración.

Parámetros fisiológicos.

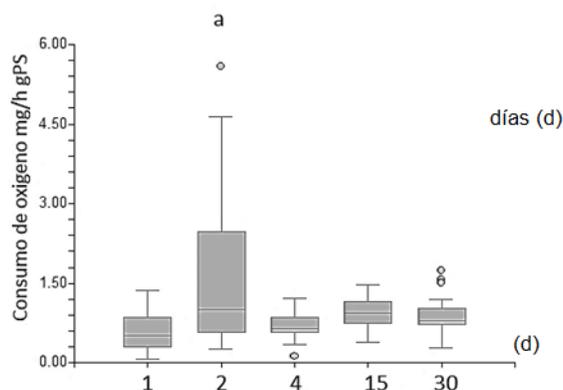
Se compararon las respuestas de los organismos a las diferentes condiciones y se determinó que hubo diferencias entre los organismos control y los expuestos en los días dos y 15 (tabla 11)

Tabla 11. Parámetros fisiológicos determinados en los diferentes días durante el bioensayo (promedio \pm desviación estándar).

Fase de evaluación y días evaluados	Consumo de oxígeno (mg/h* gPS)		Excreción nitrogenada (mg/h*gPS)		Relación O:N	
	Promedio \pm DS	Mínimo – máximo	Promedio \pm DS	Mínimo – Máximo	Promedio \pm DS	Mínimo - máximo
1 Exposición 1 (24 h), 2 (48 h), 4 (96 h)	0.56 \pm 0.35	0.07 - 1.37	0.07 \pm 0.05	0.02 - 0.30	10.08 \pm 5.88	2.50 -26.15
	1.65 \pm 1.33 ^a	0.25 – 5.60	0.52 \pm 0.28 ^b	0.17 - 1.34	7.57 \pm 13.92 ^c	0.50-60.36
	0.70 \pm 0.24	0.11 - 1.21	0.01 \pm 0.01	0.00 - 0.06	56.02 \pm 35.35	6.83–146.63
2 Depuración 15 (días), 30 (días)	0.97 \pm 0.28	0.38 - 1.47	0.06 \pm 0.03 ^d	0.01- 0.13	22.70 \pm 10.65 ^e	6.72 – 42.50
	0.86 \pm 0.31	0.27 - 1.74	0.03 \pm 0.02	0.01 -0.17	30.93 \pm 17.74	9.37 - 90.31

Diferencias de los controles respecto a: ^a los expuestos al diésel (0.06 y 0.12%) y a al biodiesel 0.12%; ^b a todos los expuestos; ^c a todos excepto a los de biodiesel y la mezcla 0.06; ^d al diésel y a la mezcla 0.06%, ^e a todos excepto a los expuestos al biodiesel 0.06 y la mezcla 0.12% ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis); el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada se registra en miligramo entre hora por gramo de peso seco (mg/h*gPS).

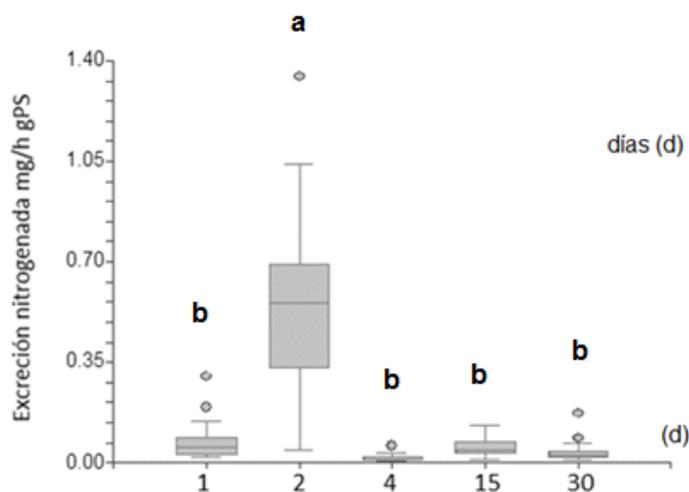
Se observó variación en el consumo de oxígeno a través del tiempo, sin embargo el mayor valor se registró en todos los organismos en el día dos (48 h de la fase de exposición) ($p < 0.05$), con un valor promedio general de 1.65 ± 1.33 mg/h/gPs, (fig. 9).



^a Diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) de los renacuajos con respecto a los analizados los demás días (d).

Figura 9. Consumo de Oxígeno (mg/h/ gPS) en los diferentes días (d) del bioensayo.

La excreción nitrogenada también fue mayor en el segundo día ($p < 0.05$) con una tasa de 0.52 ± 0.28 mg/h/gPS (fig. 10).



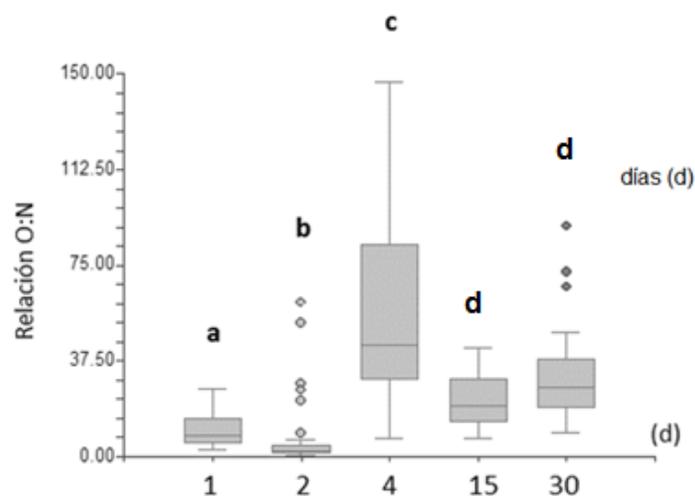
*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) de los organismos evaluados durante los días(d). del ensayo*

Figura 10. Excreción nitrogenada (mg/h/gPS) de los organismos durante el bioensayo.

Los resultados de la relación O:N demuestran que en este mismo día los valores fueron bajos con una media de 7.57 ± 13.92 mg/h/gPs, con respecto a los demás días ($p < 0.05$), como se muestra en la figura 11.

Además del comportamiento mostrado en el día dos, cabe mencionar que en la fase de depuración (días 15 y 30) los valores de excreción nitrogenada que se registraron fueron 0.06 ± 0.30 y 0.03 ± 0.02 mg/h gPS, en dicho orden. Estas cifras mostraron diferencias significativas al ser comparadas entre sí ($p < 0.05$).

En los días 15 y 30 se observó también que el estrés metabólico registrado fue 22.70 ± 10.65 y 30.93 ± 17.74 , y las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (fig. 11).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la evaluación de la razón O:N

Figura 11. Relación O: N de los organismos, evaluado en diferentes días del bioensayo.

Las variaciones de los parámetros fisiológicos para cada condición experimental se detallan a continuación (tabla 12).

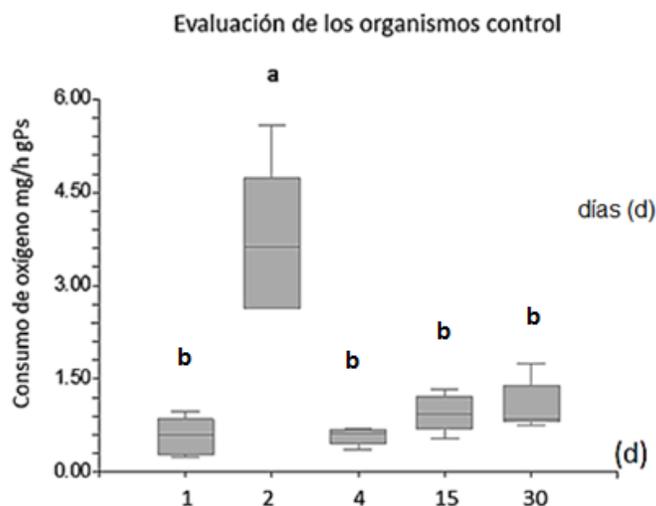
Tabla 12 Parámetros fisiológicos de los organismos (Valores promedio).

Concentraciones	Consumo de oxígeno (mg/h*gPS)		Excreción nitrogenada (mg/h* gPS)		Relación O:N	
	Promedio ± DS	Mínimo – máximo	Promedio ± DS	Mínimo – máximo	Promedio ± DS	Mínimo – máximo
Controles	1.36 ± 1.31 ^a	0.25 - 5.59	0.05± 0.043 ^a	0.01 - 0.15	33.38 ± 4.40 ^a	8.31 – 83.67
FSD 0.06%	0.80 ± 0.35	0.11 -1.45	0.15± 0.21 ^a	0.01 - 0.78	17.99 ± 17.81 ^a	0.5 - 72.25
FSD 0.12%	0.74 ± 0.33 ^a	0.14 -1.17	0.149 ± 0.23 ^a	0.01 - 0.73	24.42 ± 26.31 ^a	0.82 – 92.64
FSB 0.06%	1.04 ± 0.97 ^a	0.17 - 4.63	0.14 ± 0.22 ^a	0.01 - 0.69	27.83 ± 26.83 ^a	1.80 – 102..0
FSB 0.12%	0.75 ± 0.39	0.25 - 2.40	0.16 ± 0.27 ^a	0.00 - 1.03	24.00± 26.93 ^a	0.50 – 138.53
FSM 0.06%	1.02 ± 0.64 ^a	0.47 - 3.15	0.17 ± 0.29 ^a	0.00 - 1.34	30.46 ± 39.50 ^a	2.49 – 146.63
FSM 0.12%	0.90 ± 0.52 ^a	0.07 - 2.12	0.15 ± 0.23 ^a	0.01 - 0.83	20.15 ± 3.44 ^{a a}	1.80 – 61.87

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, Kruskal – Wallis). Tanto el consumo de oxígeno como la excreción nitrogenada se registraron en miligramo entre hora por gramo de peso seco (mg/h*gPS), en todas las condiciones experimentales, fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiésel (FSB) y fracción soluble de la mezcla (FSM).

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno de los organismos control presentaron diferencias significativas solo el segundo día ($p < 0.05$), en el que se consumió más oxígeno (promedio 3.67 ± 1.20 mg/h gPS), como se muestra en la Figura 12. La media de este parámetro en los organismos expuestos a los combustibles fue 1.39 ± 1.03 mg/h gPS.



*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) de los organismos evaluados en los demás días (d).*

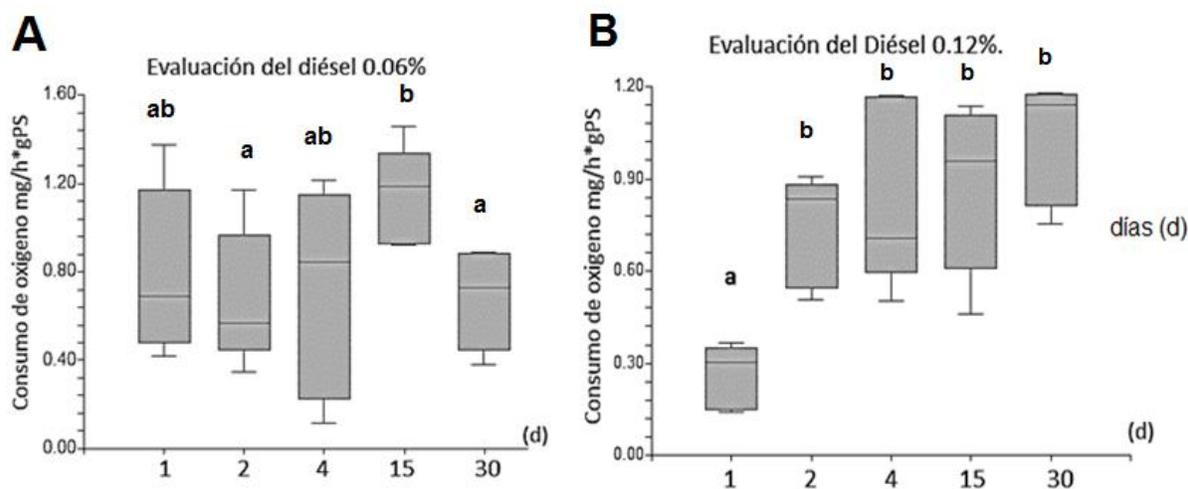
Figura 12. Consumo de Oxígeno (mg/h*gPS) de los organismos control.

En los organismos expuestos a la FSD 0.06% el consumo de oxígeno promedio fue 0.80 ± 0.35 mg/h gPs, en este se mostraron diferencias significativas entre los organismos expuestos el día 15 con respecto a los de los días dos y el día 30 (fig. 13). Únicamente en la concentración 0.12% se observó un consumo menor el primer día ($p < 0.05$) (fig. 13b). Al comparar las concentraciones 0.06 y la 0.12%, no se encontraron diferencias significativas entre estas.

Se registraron desigualdades estadísticamente significativas en los especímenes expuestos a la FSB 0.06%, presentando una media de 1.05 ± 0.97 mg/h gPs. En el día dos se observó un mayor

consumo de oxígeno con respecto a los demás días (Figura 14). Los resultados de la comparación entre las concentraciones 0.06 y 0.12% no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (tabla 12).

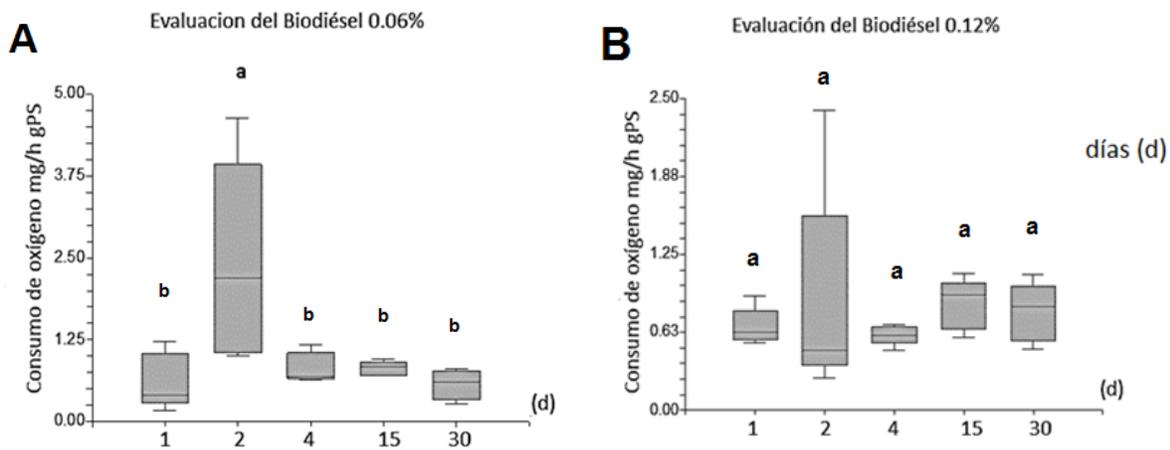
Se demostró que los renacuajos sometidos a la concentración de 0.06% de la FSM presentaron una tasa baja en el consumo de oxígeno los días uno y cuatro con respecto al día 15 ($p < 0.05$). De manera similar, se manifestaron diferencias en el caso de los animales que se colocaron en las cámaras de la FSM 0.12%, pues los valores que se presentaron el día uno fueron bajos con respecto a los días dos y 30 ($p < 0.05$), como se muestra en la Figura 15. Sin embargo, se observó similitud en el consumo de O_2 de los organismos expuestos a las dos concentraciones de la mezcla, con valores de 1.02 ± 0.64 mg/h*gPS en la FSM 0.06% y de 0.90 ± 0.52 mg/h/gPS en la FSM 0.12%.



*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) en los renacuajos analizados los diferentes días.*

*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) en los renacuajos analizados los diferentes días.*

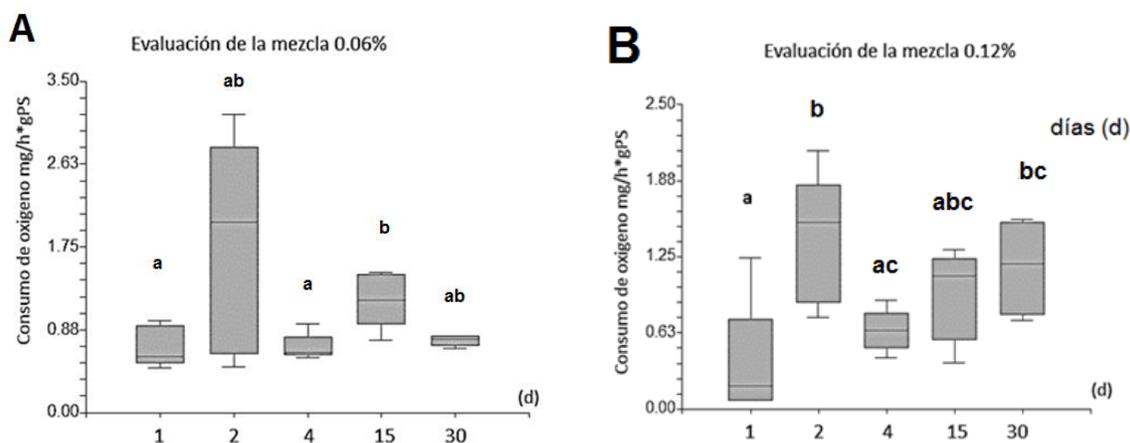
Figura 13. Consumo de Oxígeno (mg/h*gPS), de los organismos expuestos a las fracciones solubles del diésel (FSD); al 0.06% (a) y al 0.12% (b), obtenidos los días (d) de bioensayo.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) en los renacuajos analizados los diferentes días.

No hubo diferencias significativas en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) de los organismos evaluados.

Figura 14. Consumo de Oxígeno ($\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$), en organismos expuestos a las fracciones solubles del biodiésel (FSB); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b)



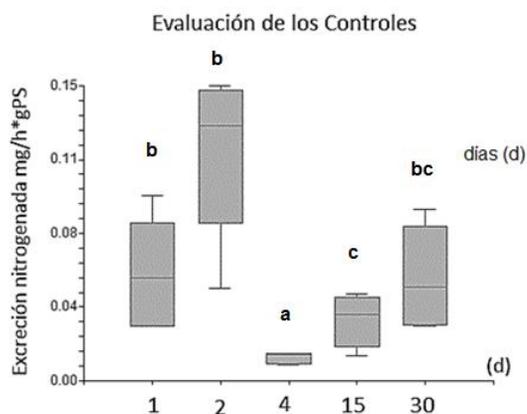
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) en los renacuajos analizados los diferentes días.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) en los renacuajos analizados los diferentes días.

Figura 15. Consumo de oxígeno ($\text{mg/h} \cdot \text{gPs}$), en organismos expuesto a las fracciones solubles de la mezcla (FSM); a la 0.06% (a) y a la FSM 0.12 % (b)

Excreción nitrogenada.

La excreción nitrogenada de los controles varió a lo largo del ensayo como se puede observar en la tabla 12. Los índices obtenidos fueron diferentes a través de los días del bioensayo; en el día cuatro el valor fue significativamente menor que los demás días ($p < 0.05$) (fig. 16).

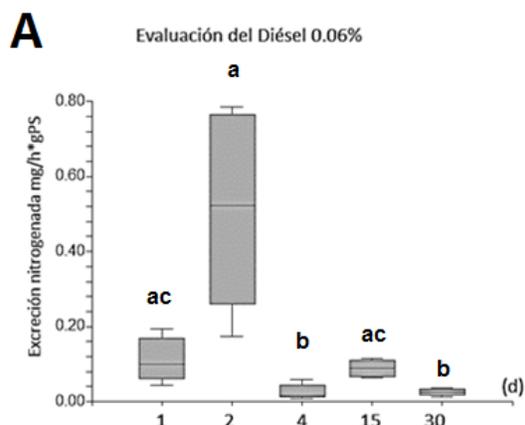


*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) en los renacuajos analizados los diferentes días.*

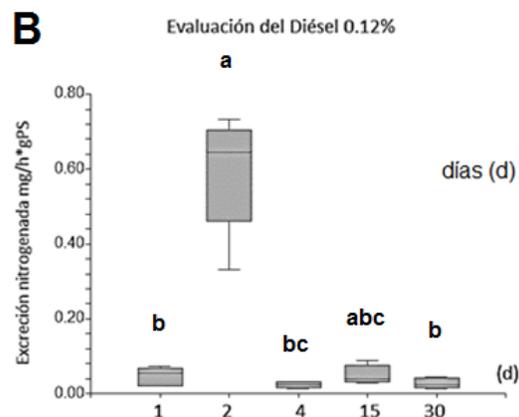
Figura 16. Excreción nitrogenada (mg/h*gPS) de los organismos control.

Se observaron diferencias significativas en los organismos expuestos a la FSD 0.06% y a la FSD 0.12% ($p < 0.05$) en el tiempo que duró el ensayo. Se determinó que aunque hubo diferencias entre los días, el día dos presentó mayor excreción amoniacal en ambas concentraciones (fig. 17), lo cual es similar al comportamiento que tuvieron los organismos control. El análisis estadístico corroboró similitud en la excreción nitrogenada de los organismos expuestos al comparar los datos de ambas concentraciones ($p > 0.05$) con valores de 0.15 ± 0.21 en la FSD 0.06% y de 0.15 ± 0.23 en la FSD 0.125%.

De la misma manera que en los casos descritos con anterioridad, en el día dos se registró un alto índice de excreción nitrogenada en los organismos expuestos a las dos concentraciones del biodiesel ($p < 0.05$) (fig. 18). El análisis estadístico confirmó que no hubo diferencias entre los promedios de las dos concentraciones de la FSB (0.06% = 0.14 ± 0.22 mg/h gPs y 0.12% = 0.16 ± 0.27 mg/h gPs) ($p > 0.05$) (tabla 12).

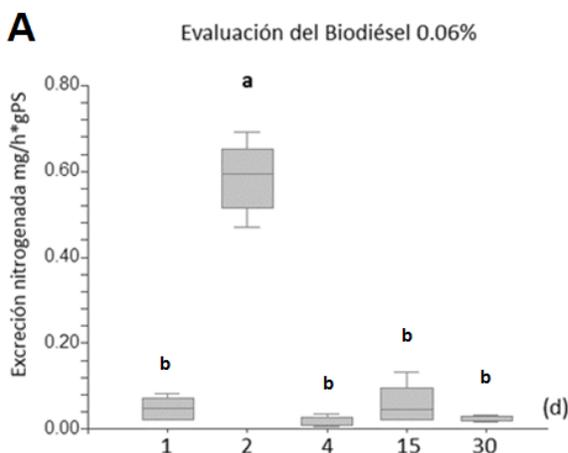


Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) en los renacuajos analizados los diferentes días.

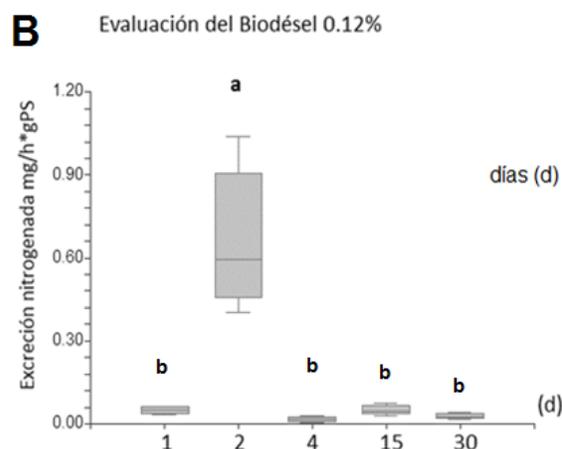


Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) en los renacuajos analizados los diferentes días.

Figura 17. Excreción nitrogenada ($\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) de los organismos expuestos a las fracciones solubles del diésel (FSD); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).



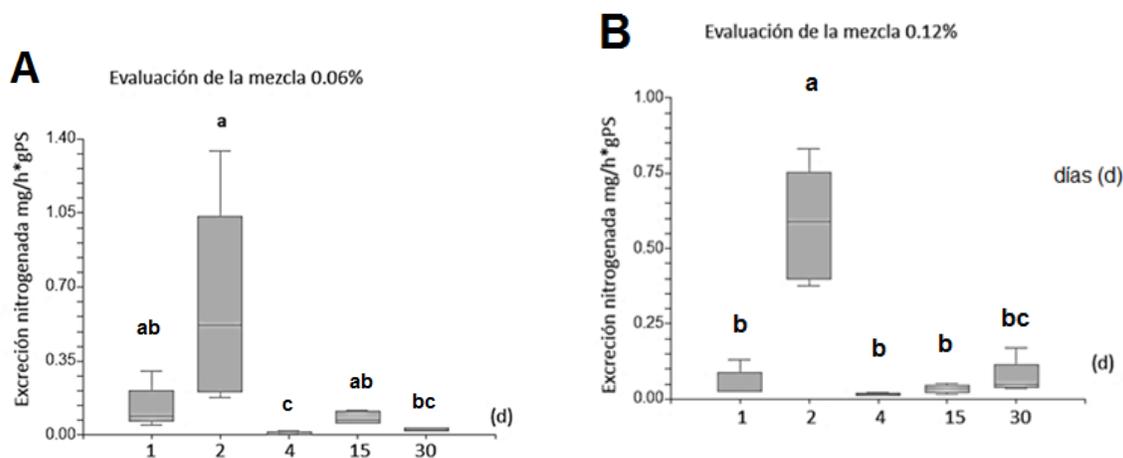
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) en los renacuajos analizados los diferentes días.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco $\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$) en los renacuajos analizados los diferentes días.

Figura 18. Excreción nitrogenada ($\text{mg/h} \cdot \text{gPS}$), de los organismos expuestos a las fracciones solubles del biodiésel (FSB); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).

Por último, los organismos expuestos a la FSM presentaron también un comportamiento semejante; es decir, el día dos se registraron valores más altos en comparación otros días (fig. 19). Entre ambas concentraciones no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$), con valores de 0.17 ± 0.29 mg/h*gPs en la FSM 0.06% y 0.15 ± 0.23 mg/h*gPs en la FSM 0.12% (tabla 12).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPs) en los renacuajos analizados los diferentes días.

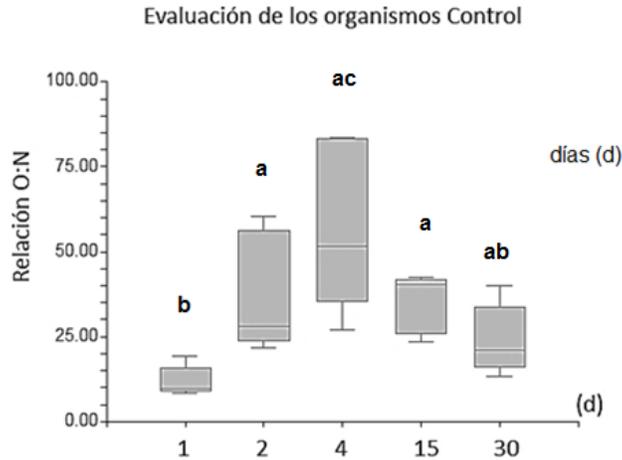
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPs) en los renacuajos analizados los diferentes días.

Figura 19. Excreción nitrogenada (mg/h/ gPs), de los organismos expuestos a las fracciones solubles de la mezcla (FSM); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b)

Estrés metabólico: relación O:N

Los resultados obtenidos en la evaluación de estrés metabólico a través de la relación oxígeno-nitrógeno (O:N) se muestran a continuación:

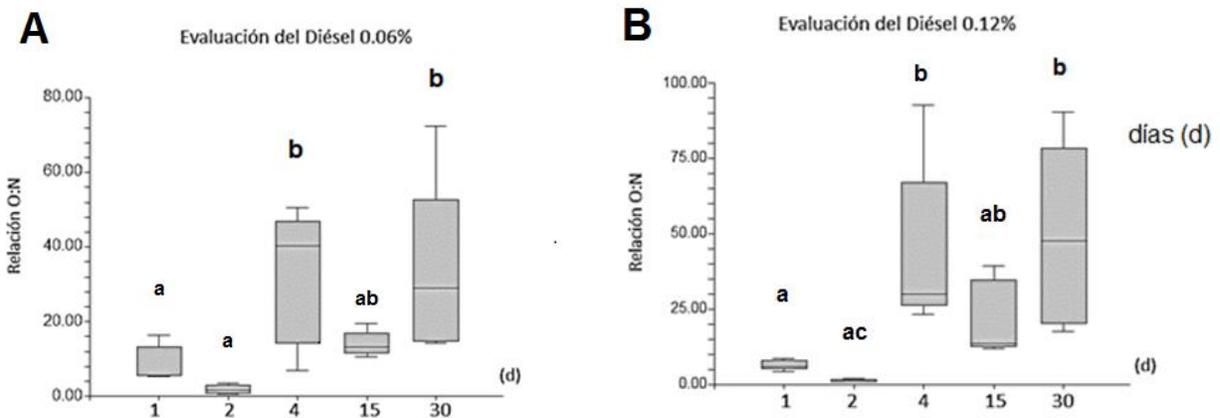
Los organismos control mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) (tabla 12); el día cuatro se registraron valores mayores de O:N (57.85 ± 24.86) con respecto a los días uno (11.89 ± 4.40 de la fase de exposición) y 15 (35.32 ± 8.65 de la fase de depuración), como se muestra en la figura 20.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos los diferentes días.

Figura 20. Relación O:N de los organismos control.

Los organismos expuestos a la FSD presentaron diferencias en los días del ensayo. En la FS (0.06%) la relación O:N, fue mayor días cuatro y 30 con respecto al día dos ($p < 0.05$), en el caso de la FS (0.12%), también se obtuvieron valores mayores los mismos días (cuatro y 30) con respecto a los días uno y dos (fig. 21).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos los diferentes días.

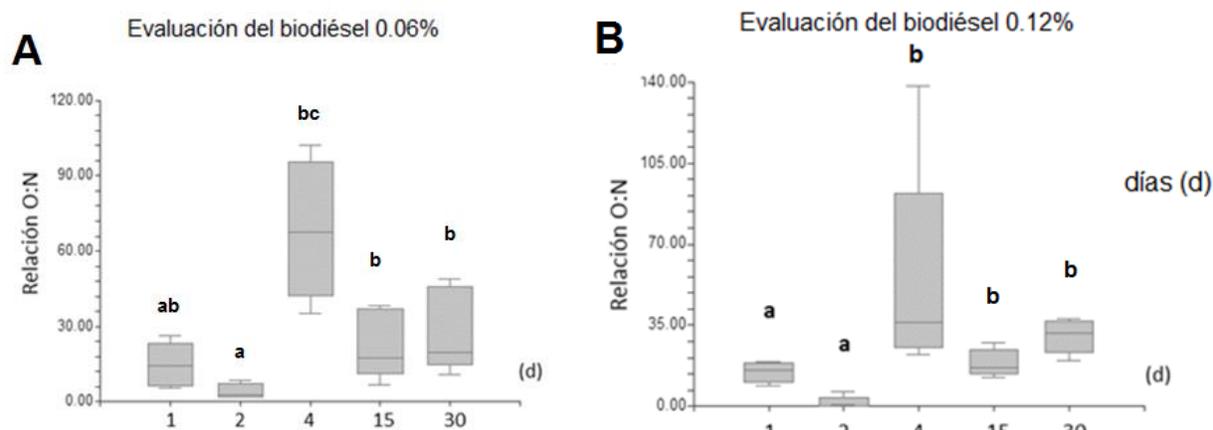
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos los diferentes días.

Figura 21. Relación O:N de los organismos expuestos a la fracciones solubles del diésel (FSD); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).

El análisis comparativo entre las fracciones del diésel determinó que hubo semejanza entre la relación O:N de los animales expuestos a ambas concentraciones ($p > 0.05$), con medias de 17.99 ± 17.81 en la FSD 0.06% y 24.42 ± 26.31 en la FSD 0.12% (tabla 12).

En los organismos expuestos a la FSB 0.06% se observaron algunas variaciones, sin embargo, los valores más altos se presentaron el día cuatro con respecto a los días uno y dos ($p < 0.05$). En la FSB 0.12% se obtuvieron valores similares, es decir, valores altos el día 4 con respecto a los días uno y dos (fig. 22).

No hubo diferencias significativas entre ambas concentraciones ($p > 0.05$), con valores de 27.83 ± 26.83 en la FSB 0.06% y 24.00 ± 26.93 en la FSB 0.12%.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos los diferentes días.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos los diferentes días.

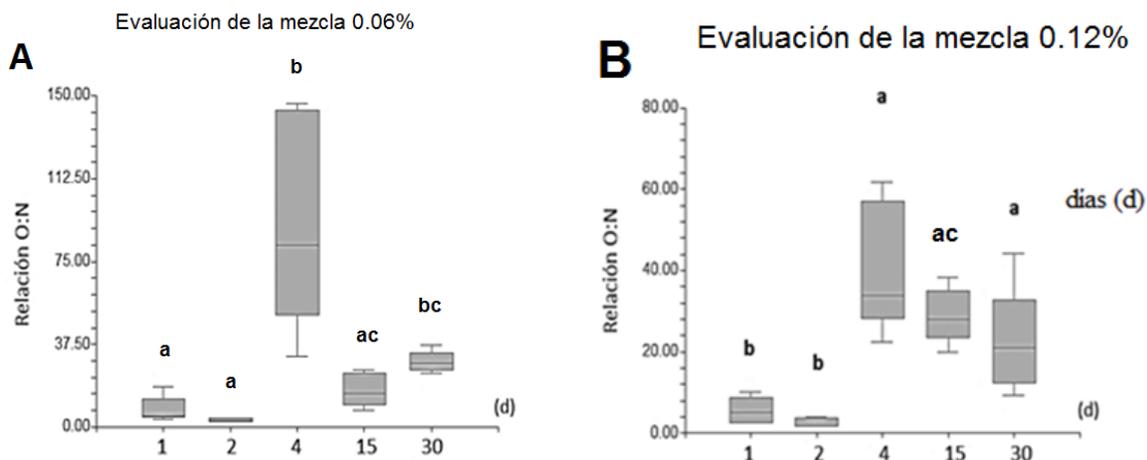
Figura 22. Relación O:N en los organismos expuestos a las fracciones solubles del biodiesel (FSB; a la 0.06% (a) y a la 0.12%. (b).

En los animales sometidos a la FSM 0.06% se obtuvo un valor mayor de O:N el día cuatro, en comparación con los demás días que duró el ensayo ($p < 0.05$). (fig. 23 a).

Aquellos organismos expuestos a la FSM 0.12% mostraron diversas desigualdades ($p < 0.05$) como se muestra en la figura 23-b. En los organismos evaluados el día cuatro se observó un valor mayor en comparación con los que se analizaron los días uno, dos y 30. De los individuos elegidos el día dos, se obtuvo una razón O:N menor que en los estudiados en

los días de la fase de recuperación (15 y 30).

En general, en los individuos de ambas concentraciones se tuvieron valores de O:N similares (en los expuestos a la FSM 0.06% se obtuvo un valor de 30.46 ± 39.50 y en la FSM 0.125% un valor de 20.15 ± 3.44).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos los diferentes días.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos los diferentes días.

Figura 23. Relación O: N, de los organismos expuestos a las fracciones solubles de la mezcla (FSM); a la 0.06% (a) y a la 0.12% (b).

Determinación de los parámetros fisiológicos cada día de ensayo

Debido a las particularidades observadas en el análisis descrito con anterioridad, se detalla el comportamiento de los organismos en cada uno de los días, más adelante.

La tabla 13 indica que se obtuvieron diferencias significativas entre los organismos control y todos los expuestos a los combustibles sólo el día dos del periodo de exposición, mientras que para el día 15 las diferencias se manifestaron únicamente en algunos lotes. Debido a lo anterior, los días dos y 15 se analizan más adelante.

Tabla 13. Análisis estadístico de los parámetros fisiológicos los días del ensayo.

Días	Consumo de oxígeno (mg/h*gPS)	Excreción nitrogenada (mg/h*gPS)	Relación O:N
1	H= 12.38, p =0.053	H= 11.21, p = 0.08	H= 13.29, p =0.03 ^a
2	H= 19.89, p =0.002 ^b	H= 13.03, p = 0.04 ^b	H= 22.57, p = 0.00 ^b
4	H= 6.25, p = 0.39	H= 9.45, p = 0.15	H= 9.36, p = 0.15
15	H= 9.31, p =0.15	H= 17.02, p = 0.01 ^c	H= 14.39, p = 0.02 ^d
30	H=13.68, p = 0.03	H= 14.56, p= 0.02	H=3.76, p=0.70

^a Diferencias entre organismos expuestos a las fracciones solubles del diésel (FSD) y a las del biodiésel (FSB); ^b Diferencias entre controles y expuestos; ^c Diferencias entre los organismos control y los expuestos a la (FSB) 0.06% y la fracción soluble de la mezcla (FSM) 0.06%; ^d Diferencias entre control y expuestos a la (FSD) 0.06% y la (FSM) 0.06%. Para este apartado se realizó un análisis no paramétrico (Kruskall- Wallis), en donde H es la distribución χ^2 (chi-cuadrado ó ji-cuadrado), es decir; es la bondad de ajuste con variables categóricas y está acompañada de una p, que si es mayor a 0.05 quiere decir que la muestra es representativa.

Comportamiento de los parámetros fisiológicos el día dos

En este día se exhibieron efectos evidentes por exposición a los combustibles. Cabe mencionar que los organismos se encontraban en periodo de exposición sin recambio de la mitad de agua, puesto que éste se realizó a las 48 h. Los resultados fueron los siguientes (tabla 14).

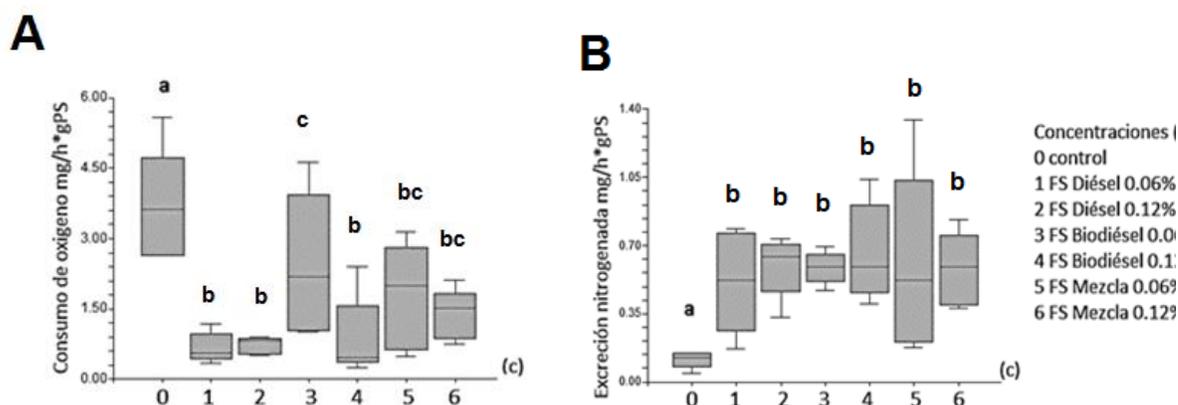
Se observó que en el día dos, los individuos sin contaminar consumieron más oxígeno que los animales contaminados ($p < 0.05$) (tabla 14), a pesar de su diferente comportamiento que tuvieron los renacuajos en sus respectivas cámaras (fig. 24-a). La comparación entre ambas concentraciones (0.06 y 0.12%) de cada combustible fue similar al compararse entre sí. En cuanto a la excreción nitrogenada los animales control presentaron valores más bajos, en comparación con los organismos expuestos ($p < 0.05$) (fig. 24-b), lo cual podría indicar un posible efecto en estos.

Con respecto a la relación O:N, se demostró que los renacuajos de las cámaras control presentaron un valor mayor ($p < 0.05$) que los especímenes expuestos a los tres combustibles (fig. 25).

Tabla 14. Parámetros fisiológicos del día 2 de exposición (promedios \pm desviaciones estándar).

Concentraciones	Consumo de oxígeno (mg/h*gPs)		Excreción nitrogenada (mg/h* gPs)		Relación O:N	
	Promedio \pm DS	Mínimo - máximo	Promedio \pm DS	Mínimo- máximo	Promedio \pm DS	Mínimo - máximo
Control	3.67 \pm 1.20 ^a	2.63 - 5.60	0.11 \pm 0.04 ^a	0.04 - 0.15	37.68 \pm 17.38 ^a	21.58 - 60.36
FSD 0.06%	0.68 \pm 0.31 ^b	0.35 - 1.17	0.51 \pm 0.26 ^b	0.17 - 0.78	1.79 \pm 1.12 ^b	0.50 - 3.35
FSD 0.12%	0.73 \pm 0.18 ^b	0.50 - 0.90	0.59 \pm 0.15 ^b	0.33 - 0.73	1.37 \pm 0.39 ^b	0.82 - 1.86
FSB 0.06%	2.43 \pm 1.53 ^c	1.01 - 4.63	0.58 \pm 0.08 ^b	0.47 - 0.69	4.39 \pm 2.82 ^b	1.80 - 8.75
FSB 0.12%	0.86 \pm 0.87 ^b	0.25 - 2.40	0.66 \pm 0.24 ^b	0.40 - 1.03	1.85 \pm 2.53 ^b	0.50 - 6.35
FSM 0.06%	1.77 \pm 1.13 ^{bc}	0.48 - 3.15	0.60 \pm 0.47 ^b	0.17 - 1.34	3.31 \pm 0.62 ^b	2.50 - 4.10
FSM 0.12%	1.39 \pm 0.53 ^{bc}	0.75 - 2.12	0.57 \pm 0.18 ^a	0.37 - 0.83	2.63 \pm 0.94 ^b	1.80 - 3.92

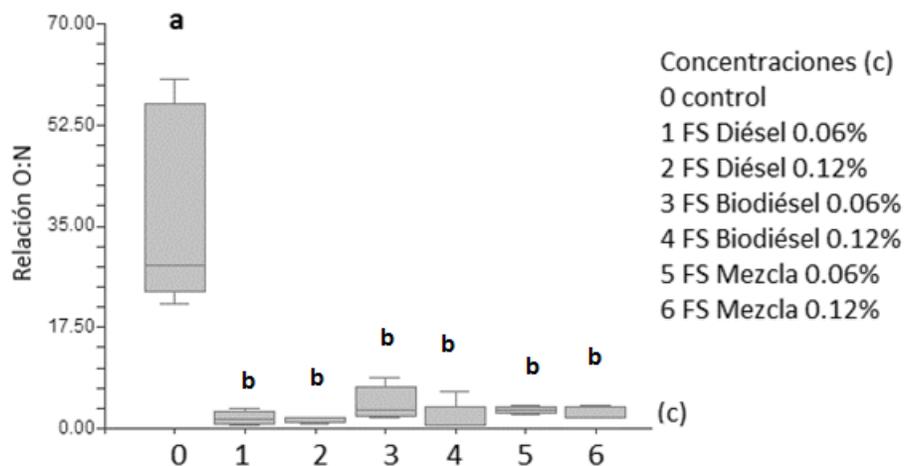
Diferencia de los organismos control respecto a: ^a todos los organismos expuestos; ^b organismos expuestos con valores bajos; ^c organismos expuestos con valores intermedios ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). Tanto el consumo de oxígeno como la excreción nitrogenada, se registró en miligramo entre hora por gramo de peso seco (mg/h*gPs); en todas las condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD); fracción soluble del biodiésel (FSB); fracción soluble de la mezcla (FSM); desviación estándar (DS).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) en los renacuajos analizados en las diferentes condiciones experimentales.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la excreción nitrogenada (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) en los renacuajos analizados en las diferentes condiciones experimentales.

Figura 24. Parámetros fisiológicos de los organismos control y los expuestos el día dos: Consumo de oxígeno (mg/h*gPS) (a) y excreción nitrogenada (mg/h*gPS) (b).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos en los renacuajos analizados en las diferentes condiciones experimentales.

Figura 25. Relación O:N de los organismos que se evaluaron el día dos.

Comportamiento de los parámetros fisiológicos el día 15

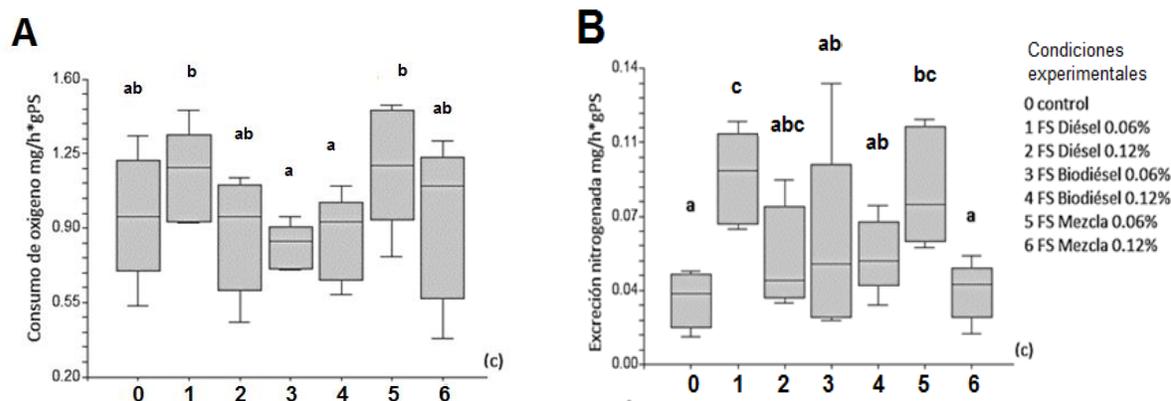
Los resultados obtenidos en el día 15 se muestran en la tabla 15. Cabe mencionar que en este día, los organismos se encontraban en periodo de depuración y a pesar de ello se observaron algunos efectos.

En este día, los organismos control mostraron diferencias en la excreción nitrogenada y la razón O:N respecto a los organismos anteriormente expuestos al diésel (0.06%) y la mezcla (0.06%), al ser comparadas entre sí (FSD 0.06 y FSM 0.06%) se obtuvieron diferencias significativas (fig. 26 y 27).

Tabla 15. Parámetros fisiológicos del día 15 de exposición (promedios \pm desviaciones estándar).

Condición experimental	Consumo de oxígeno (mg/h gPs)		Excreción nitrogenada (mg/h/ gPs)		Relación O:N	
	Promedio \pm DS	Mínimo - máximo	Promedio \pm DS	Mínimo-máximo	Promedio \pm DS	Mínimo - máximo
Control	0.95 \pm 0.29 ^{ab}	0.03 \pm 0.01 ^a	35.32 \pm 8.65 ^a	0.95 \pm 0.29 ^{ab}	0.03 \pm 0.01 ^a	35.32 \pm 8.65 ^a
FSD 0.06%	1.14 \pm 0.22 ^b	0.08 \pm 0.02 ^c	14.12 \pm 3.36 ^{bc}	1.14 \pm 0.22 ^b	0.08 \pm 0.02 ^c	14.12 \pm 3.36 ^{bc}
FSD 0.12%	0.87 \pm 0.27 ^{ab}	0.05 \pm 0.02 ^{abc}	21.72 \pm 12.39 ^{bc}	0.87 \pm 0.27 ^{ab}	0.05 \pm 0.02 ^{abc}	21.72 \pm 12.39 ^{bc}
FSB 0.06%	0.81 \pm 0.10 ^a	0.05 \pm 0.04 ^{ab}	22.92 \pm 13.70 ^{abc}	0.81 \pm 0.10 ^a	0.05 \pm 0.04 ^{ab}	22.92 \pm 13.70 ^{abc}
FSB 0.12%	0.85 \pm 0.20 ^a	0.05 \pm 0.01 ^{ab}	18.70 \pm 5.73 ^b	0.85 \pm 0.20 ^a	0.05 \pm 0.01 ^{ab}	18.70 \pm 5.73 ^b
FSM 0.06%	1.19 \pm 0.28 ^b	0.08 \pm 0.02 ^{bc}	17.02 \pm 7.46 ^b	1.19 \pm 0.28 ^b	0.08 \pm 0.02 ^{bc}	17.02 \pm 7.46 ^b
FSM 0.12%	0.94 \pm 0.37 ^{ab}	0.03 \pm 0.01 ^a	29.10 \pm 6.70 ^a	0.94 \pm 0.37 ^{ab}	0.03 \pm 0.01 ^a	29.10 \pm 6.70 ^a

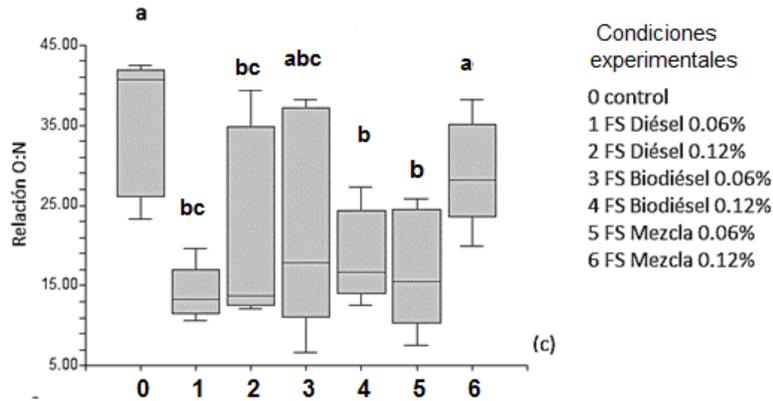
En consumo de oxígeno ^a Diferente de ^b; en excreción nitrogenada ^a diferente de ^c ; En O:N ^a Diferente de ^b y ^c ($p < 0.05$). Tanto el consumo de oxígeno como la excreción nitrogenada se registraron en miligramo entre hora por gramo de peso seco (mg/h*gPs); esto fue calculado en todas las condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD); fracción soluble del biodiésel (FSB); fracción soluble de la mezcla (FSM); desviación estándar (DS).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) en los renacuajos analizados en las diferentes condiciones experimentales.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de oxígeno (miligramos entre hora por gramos de peso seco mg/h*gPS) en los renacuajos analizados en las diferentes condiciones experimentales.

Figura 26. Parámetros fisiológicos de los organismos control y los expuestos el día 15: Consumo de oxígeno (mg/h*gPS) (a) y excreción nitrogenada (mg/h*gPS) (b).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la razón Oxígeno-Nitrógeno (O:N) evaluados en los renacuajos en los renacuajos analizados en las diferentes condiciones experimentales.

Figura 27. Relación O:N de los organismos que se evaluaron el día 15.

En los organismos evaluados el día 30 se registraron algunas diferencias en cuanto al consumo de oxígeno y en la relación O:N, pero no en la excreción nitrogenada. Sin embargo, las diferencias detectadas no fueron entre controles y expuestos, sino entre los expuestos a biodiesel (0.06%) y la mezcla (0.12%). En este día el efecto de los combustibles no fue determinante. Debido a lo anterior, se consideró adecuado comparar los días dos y 15. Se observó que no se presentaron diferencias ($p > 0.05$) en el consumo de oxígeno (1.65 ± 1.33 y 0.97 ± 0.28 mg/h*gPs, respectivamente).

En contraste, en los valores de la excreción nitrogenada se observaron diferencias en la evaluación comparativa entre ambos días ($p < 0.05$); el índice de este parámetro fisiológico fue mayor el día dos (0.52 ± 0.28 mg/h/gPS) que el día 15 (0.06 ± 0.03 mg/h/gPS). Por otro lado, en la evaluación de estrés metabólico se observaron diferencias en la relación O:N de los organismos en ambos días ($p < 0.05$) con valores de 7.57 ± 13.92 el día dos y 22.70 ± 10.65 , el día 15.

Estos resultados se detallan a continuación. Los valores obtenidos en la relación O:N en los organismos control fue de 37.68 el día dos; éste es un valor que se encuentra dentro de los parámetros normales de estrés metabólico (Mayzaud & Conover, 1988), no obstante, en los animales expuestos los valores fueron bajos. En la FSD fueron 1.79 y 1.37, en la FSB

4.39 y 1.85 y por último en la FSM 3.31 y 2.63 y (tabla 14 y figura 25).

En lo que respecta a los resultados obtenidos el día 15, los organismos control presentaron una tasa O:N de 35.32, la cual fue similar a la del día dos, sin embargo, los renacuajos contaminados si bien no mostraron valores tan contrastantes como en el día dos, si se observaron algunos efectos, pues se obtuvieron valores inferiores en la razón O:N, aunque eso sucedió únicamente en los animales contaminados por la FSD 0.06% (14.12) y por la FSM 0.06% (17.02) (fig. 27), en comparación con los controles. Con el análisis estadístico se confirmó que la razón O:N de los organismos expuestos a los combustibles fue menor el día dos que el día 15 ($p < 0.05$).

Estrés oxidativo

Los valores de este biomarcador, determinados a través de la actividad enzimática de la catalasa, se reportan a continuación:

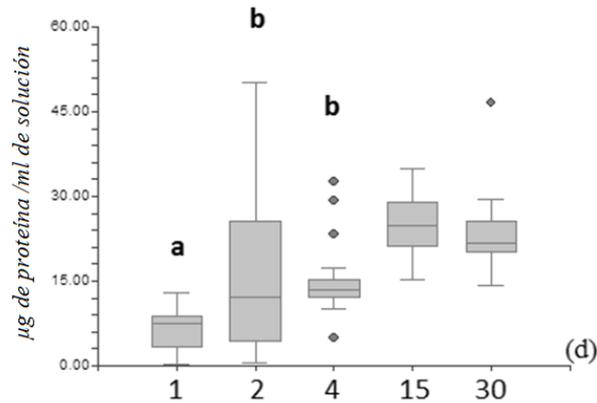
Contenido de proteínas

Se observaron ciertas diferencias a través de los días de ensayo ($p < 0.05$), como se muestra en la tabla 16 y figura 28. Los días uno, dos y cuatro (periodo de exposición durante el cual no se alimentaron) los organismos presentaron menor contenido proteínico.

Tabla 16. Contenido de proteínas (mg de proteína/ml de solución, promedio \pm desviación estándar).

Proteínas (μl/g de tejido)			
Fase experimental	Día de evaluación	Promedio \pm DS	Mínimo - máximo
Exposición	1 (24 h)	6.54 \pm 3.35 ^a	0.11 – 12.98
	2 (48 h)	15.44 \pm 13.60 ^b	0.39 – 50.14
	4 (96 h)	14.66 \pm 4.96 ^b	4.87 – 32.67
Depuración	15	24.77 \pm 4.93	15.34 – 34.83
	30	23.04 \pm 5.55	14.24 – 46.50

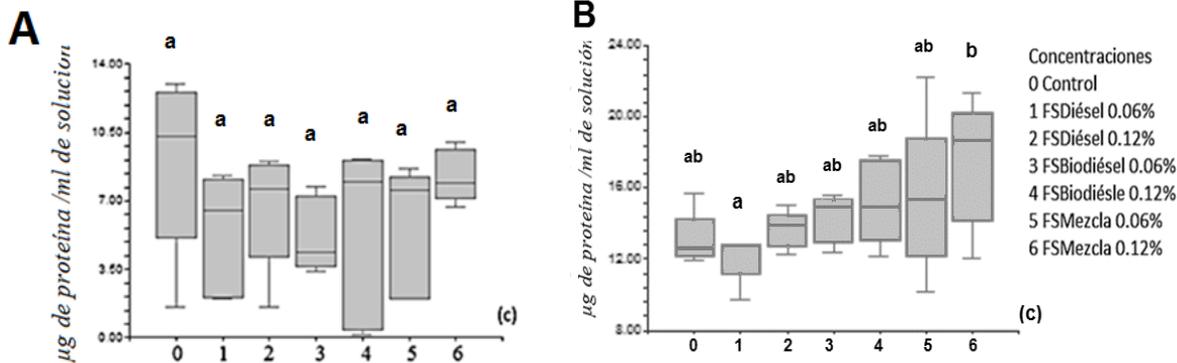
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en los organismos analizados durante el bioensayo. En esta tabla se evalúa el contenido proteínico en microgramo (μ g) de proteína por ml de solución en los organismos evaluados, y para ello se obtuvieron los promedios \pm la desviación estándar (DS), durante el bioensayo



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en los diferentes organismos evaluados durante el bioensayo. El contenido de proteínas se registró en microgramo (μg) de proteína por ml de solución de todos los organismos evaluados en los organismos, en los días que perduró el ensayo.

Figura 28. Contenido de proteínas.

En esta prueba no se demostraron diferencias significativas entre los organismos control y los expuestos ($p > 0.05$); sin embargo, se presentaron algunas variaciones en los valores obtenidos los días uno y el 15 (tabla 16). Los organismos control analizados el día uno presentaron un valor de 9.14 ± 4.56 μg de proteína/ml de solución, y los expuestos un valor de 6.10 ± 2.10 μg de proteína/ml de solución. El día 15 los individuos control mostraron un valor de 26.04 ± 3.15 μg de proteína/ml de solución y los expuestos un valor de 24.56 ± 5.18 μg de proteína/ml de solución. No obstante, en este día (el 15) se observó una diferencia, la cual fue entre los ejemplares intoxicados con la FSD 0.06% (20.18 ± 1.52) y los expuestos con la FSM 0.12% (29.58 ± 6.67).



No hubo \neq significativas.

La evaluación del contenido proteínico se registró en μg de proteína/ml de solución de los organismos evaluados, en las diferentes condiciones y concentraciones (c) experimentales

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la evaluación del contenido proteínico, la cual se registró en μg de proteína/ml de solución de los organismos evaluados en las diferentes condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiesel (FSB), fracción soluble de la mezcla (FSM).}

Figura 29. Proteínas (μg de proteína/ml de solución) los días uno y 15.

Actividad enzimática de la catalasa

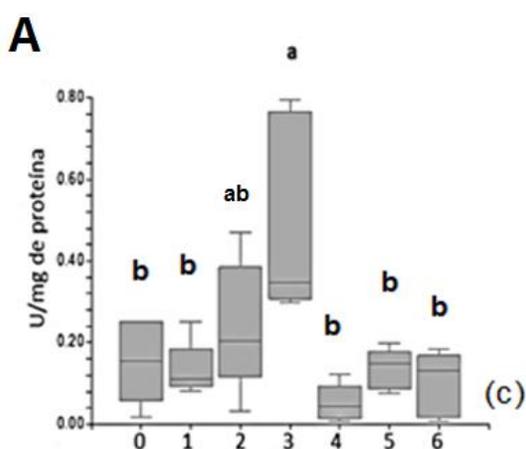
Los organismos expuestos a la FSB 0.06% presentaron un comportamiento estable a lo largo del bioensayo, de manera similar a los controles. Por otro lado, los animales que se intoxicaron con las FS (0.06 y 0.12%) de los otros dos combustibles mostraron una conducta variable durante los días que duró el bioensayo, como se muestra en la tabla 17.

En general todos los organismos (controles y expuestos) presentaron menor actividad enzimática los días uno, dos y 15 (fig. 30); sin embargo, en los días cuatro y 30 se registró una mayor tasa de descomposición de H_2O_2 en los animales que se contaminaron en comparación con los controles, lo cual es evidencia de daño.

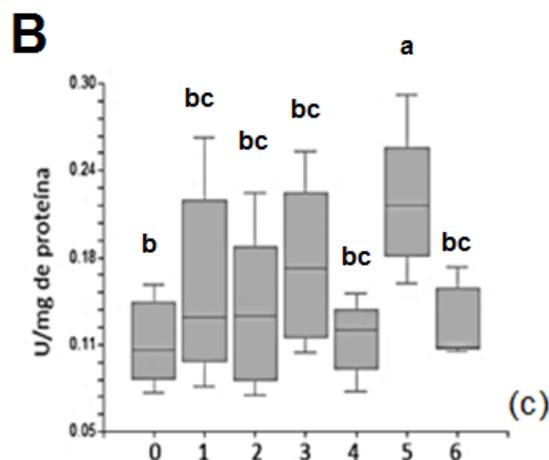
Tabla 17. Actividad enzimática de la catalasa (media \pm desviación estándar) en las diferentes condiciones experimentales.

Condición experimental	Cantidad de catalasa (U/mg de proteína)	
	Promedio \pm DS	Mínimo -Máximo
Control	0.10 \pm 0.07 ^a	0.01 - 0.25
FSD 0.06%	0.16 \pm 0.09 ^b	0.01 - 0.35
FSD0.12%	0.23 \pm 0.12 ^b	0.03 -0.47
FSB0.06%	0.14 \pm 0.24 ^a	0.00 - 0.73
FSB0.12%	0.18 \pm 0.13 ^b	0.1 - 0.42
FSM0.06%	0.22 \pm 0.12 ^b	0.00 - 0.42
FSM0.12%	0.19 \pm 0.13 ^b	0.01 - 0.41

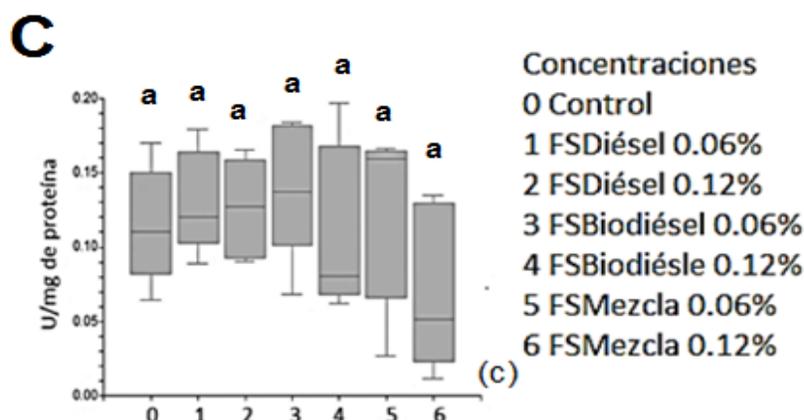
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los días evaluados ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). La cantidad de catalasa fue evaluada en micromoles de peróxido (U) entre miligramos (mg) de proteínas y se reportaron los promedios \pm desviación estándar (DS), en todas las condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD); fracción soluble del biodiésel (FSB); fracción soluble de la mezcla (FSM).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los organismos analizados en las diferentes condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiésel (FSB), fracción soluble de la mezcla (FSM).

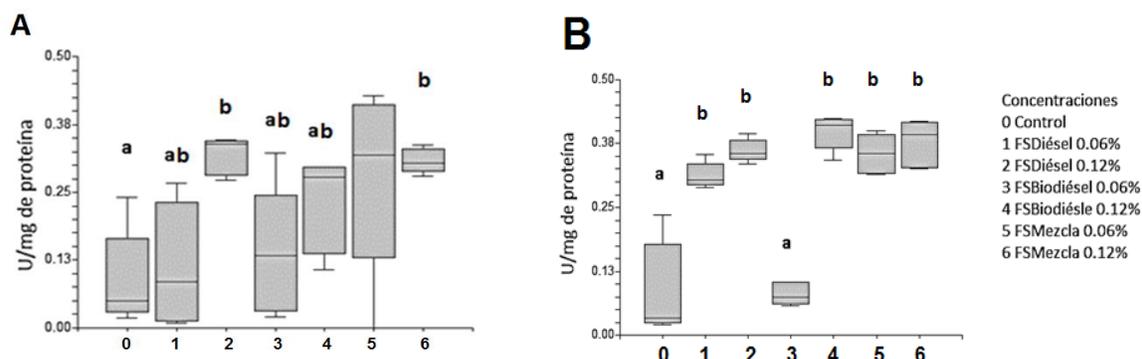


Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los organismos analizados en las diferentes condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiésel (FSB), fracción soluble de la mezcla (FSM).



No hubo \neq significativas entre las diferentes condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiesel (FSB), fracción soluble de la mezcla (FSM).

Figura 30. Contenido de catalasa (U/mg de proteína) los días uno (a), dos (b) y 15 (c).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la evaluación de la actividad enzimática de la catalasa, registrada en micromoles de peróxido (U) entre miligramos (mg) de proteínas en las diferentes condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiesel (FSB), fracción soluble de la mezcla (FSM).

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la evaluación de la actividad enzimática de la catalasa, registrada en micromoles de peróxido (U) entre miligramos (mg) de proteínas en las diferentes condiciones experimentales; fracción soluble del diésel (FSD), fracción soluble del biodiesel (FSB), fracción soluble de la mezcla (FSM).

Figura 31. Contenido de catalasa (U/mg de proteína) en los días cuatro (a) y 30 (b).

Estos hallazgos sugieren que la evaluación debe ser más continua para poder observar con mayor facilidad el estrés oxidativo a través de la actividad enzimática de la catalasa y en consecuencia el posible daño en los organismos.

5.6 Integración de resultados

Los resultados obtenidos de los parámetros evaluados en la fase subletal permitieron realizar el análisis de coeficiente de correlación de Spearman el cual demostró que hubo una relación entre casi todas las variables, mismas que se dividieron en tres secciones: datos morfológicos, datos fisicoquímicos y datos de respuesta de los organismos hacia los contaminantes. Sin embargo, sólo se mencionan los resultados más relevantes.

Datos morfológicos

La longitud, el peso húmedo y el ancho estuvieron correlacionadas entre sí de manera directa y positiva; entre el peso y la longitud el valor de r fue de 0.56 ($p < 0.01$), mientras que entre el peso y la anchura r fue 0.42 ($p < 0.01$). Por otro lado, la correlación entre la anchura y la longitud tuvo una r de 0.52 ($p < 0.01$) (fig. 32), lo cual significa que a pesar de la intoxicación, todos los organismos mantuvieron datos morfométricos similares a lo largo del ensayo. También se encontró una correlación directa entre el peso y la cantidad de proteínas en tejido $r = 0.50$; $p < 0.01$.

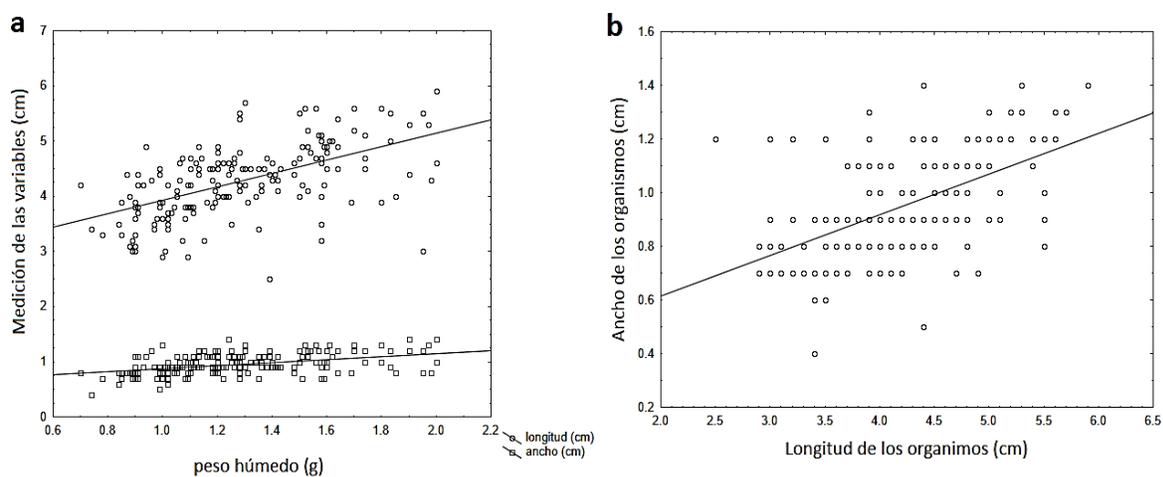
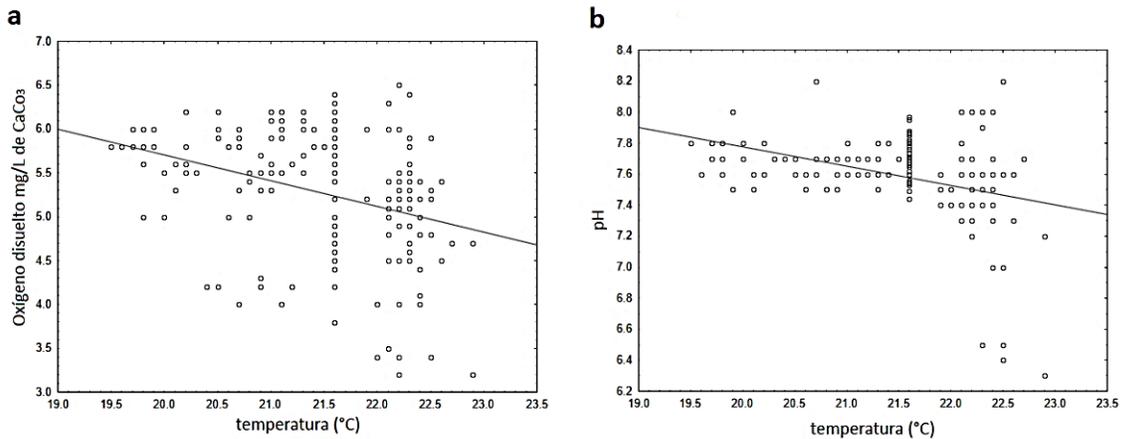


Figura 32. Correlaciones entre el peso y la longitud (a), entre el peso y la anchura (a) y entre la anchura y la longitud (b).

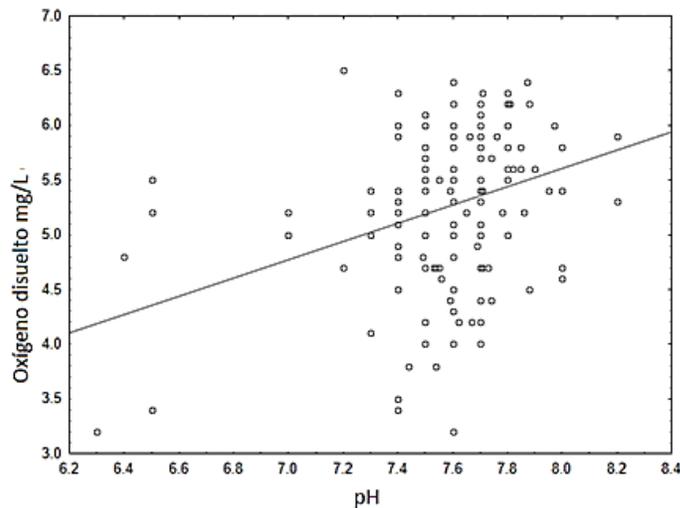
Datos fisicoquímicos

Se observó reciprocidad negativa entre la temperatura y el oxígeno disuelto del agua ($r = -0.33$; $p < 0.01$), y entre el pH y la temperatura del agua ($r = -0.37$; $p < 0.01$) (fig. 33). Sin embargo se obtuvo una correlación positiva entre el pH y el OD del agua ($r = 0.31$; $p < 0.01$) (fig. 34).



El oxígeno disuelto se registró en miligramos por litro (mg/L) de carbonato de calcio (de CaCO₃).

Figura 33. Correlaciones entre temperatura y oxígeno disuelto (a) y entre temperatura y pH (b).



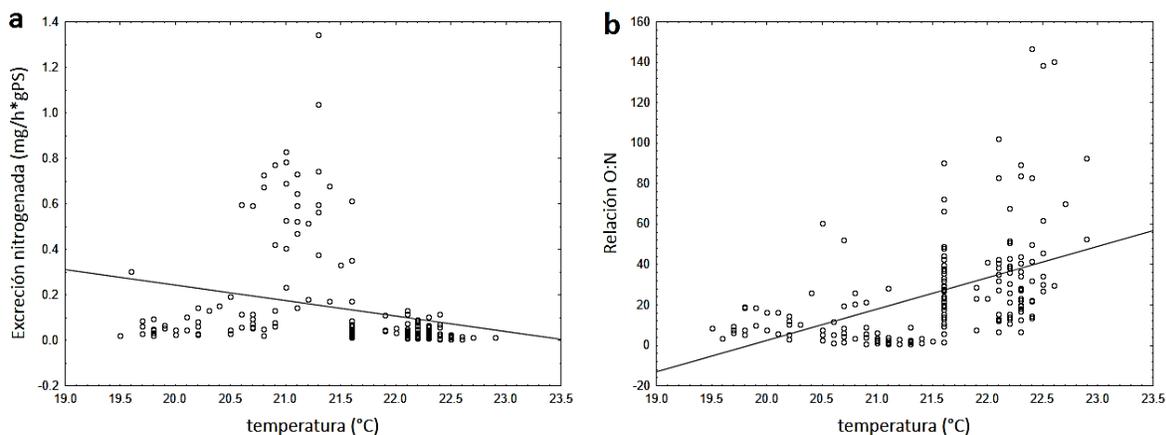
El oxígeno disuelto se registró en miligramos por litro (mg/L) de carbonato de calcio (de CaCO₃).

Figura 34. Correlación entre pH y OD del agua.

Estos resultados concuerdan con los de Fuentes & Massol-Deyá (2002), quienes mencionan que al aumentar la temperatura del agua, disminuyen los niveles de oxígeno disuelto, por lo que la correlación entre estas variables son directamente proporcional y de esta manera puede afectar las tasas de mortalidad de algunos organismos.

Se encontraron otras correlaciones tanto positivas, como negativas entre la temperatura y otras variables evaluadas; por un lado con la excreción nitrogenada se obtuvo una relación inversa con un valor de $r = -0.24$ ($p < 0.01$), mientras que con la razón O:N fue positiva con una r de 0.50 ($p < 0.01$) (fig. 35).

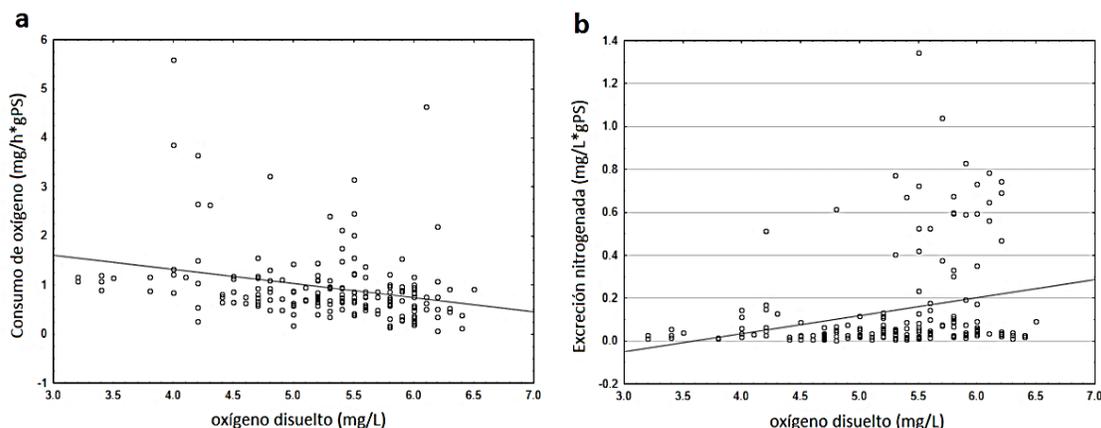
Lo mismo sucedió en el caso del oxígeno disuelto en el agua de las cámaras de los organismos y algunas variables; se obtuvieron correlaciones directa e inversamente proporcionales. Por un lado al analizarlo junto con el oxígeno consumido por los animales se presentó una r negativa de -0.27 , ($p < 0.01$) y al evaluarlo junto con la excreción nitrogenada de los animales se observó una r positiva de 0.26 , ($p < 0.01$) (fig. 36), aunque con respecto a la O:N la r fue inversamente proporcional de -0.49 ($p < 0.01$) (fig. 37).



*La excreción nitrogenada de los organismos se registró en miligramo entre horas por gramo de peso seco (mg/h**gPs).*

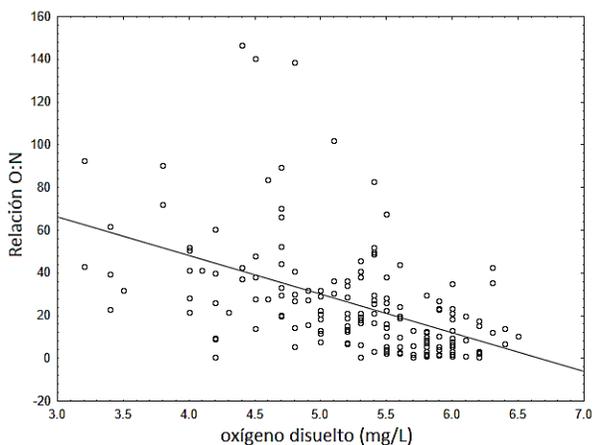
Figura 35. Correlaciones entre temperatura y excreción nitrogenada (a) y entre temperatura y relación O:N (b).

Según Espina & Vanegas (2005), en algunos organismos la fracción del amonio total (NH_3^+ , NH_4^+) presente en forma de amoniaco tiene una relación directamente proporcional con el pH y la temperatura; el amoniaco (o en este caso la excreción nitrogenada) incrementa conforme suben el pH y la temperatura. En esta investigación se obtuvo una relación inversa entre la temperatura y la excreción nitrogenada, mientras que el pH no mostró relación alguna



*El oxígeno consumido por los organismos y la excreción nitrogenada se registró en miligramo entre horas por gramo de peso seco (mg/h*gPs)*

Figura 36. Correlaciones entre el consumo de oxígeno y el oxígeno disuelto (a) y entre el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada (b).

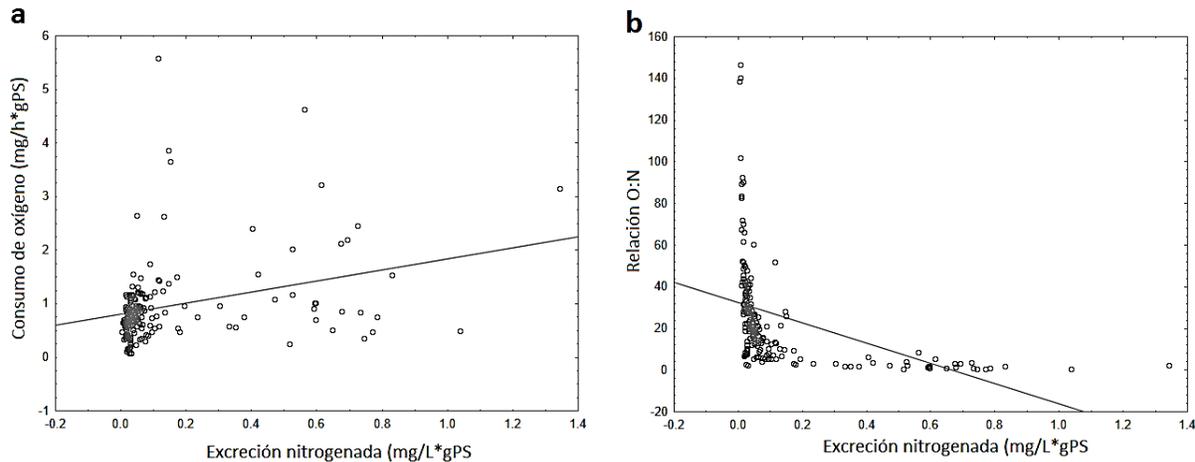


El oxígeno disuelto en el agua de las cámaras donde se encontraban los organismos se midió en miligramos por litro (mg/L).

Figura 37. Correlación entre el oxígeno disuelto y la razón O:N.

Datos de respuesta a los contaminantes

En este apartado las relaciones positivas obtenidas fueron entre el oxígeno consumido por los organismos y la excreción nitrogenada ($r = 0.31$; $p < 0.01$). Por otra parte, hubo correlación negativa entre la excreción nitrogenada y la relación O:N ($r = -0.43$; $p < 0.01$) (fig. 38).



*El oxígeno consumido por los organismos y la excreción nitrogenada se registró en miligramo entre horas por gramo de peso seco (mg/h*gPs)*

Figura 38. Correlaciones entre el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada (a) y entre la excreción nitrogenada y la razón O:N (b).

La concentración de catalasa no mostró correlación alguna con las variables fisicoquímicas, ni con las respuestas fisiológicas.

Aspectos metodológicos.

Colecta y mantenimiento de los organismos

En la actualidad existen ranarios (lugares de cultivo de ranas) con mejores condiciones para su cuidado. De acuerdo con Andreu y sus colaboradores (2015), la Secretaria de Desarrollo Agropecuario (SEDAGRO) introdujo la rana toro *L. catesbeianus* en 1993 al estado de México, pero por desconocimiento del origen de esta especie y su mal manejo, algunos individuos lograron escapar, o fueron liberados, convirtiéndose en una plaga (por su rápida reproducción). En consecuencia, se convirtieron en depredadores de muchas especies, en particular de otros anfibios.

Desde entonces algunos ranarios se rigen por manuales para el mantenimiento y la reproducción de estos animales y para la preservación de los ecosistemas. Algunos estados que utilizan dichos documentos son Nayarit (SEDER, 2005), Michoacán (CIDEM, 2010) y Yucatán (Díaz de Pascual, 2002), por mencionar algunos.

Con la utilización de estos manuales se logró mantener en mejores condiciones a los renacuajos que se utilizaron en este trabajo durante su estancia en el laboratorio, previniendo situaciones que pudieran matar o estresar a los organismos de prueba. Los parámetros fisicoquímicos que se tomaron en cuenta fueron la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, la dureza del agua y el fotoperiodo. Los valores de estos parámetros se compararon con los que emplea Xipe, (2013) y con los que se registraron en el ranario “San Lorenzo de Ciudad Hidalgo en el estado de Michoacán”, donde se obtuvieron los organismos. Cabe señalar que esto sirvió para un mejor control experimental.

El acondicionamiento de las peceras para los organismos que se utilizaron en este trabajo fueron las recomendadas por Xipe (2013), debido a que era más complicado establecer las condiciones del ranario en el laboratorio por ser un lugar abierto y con una cantidad mayor de organismos. Cabe mencionar que los resultados de esta investigación mostraron algunas variaciones en estos parámetros. A pesar de ello, los organismos no se observaron alterados (nado rápido) y sólo dos murieron antes de la exposición a los contaminantes. En consecuencia, se considera que el control de las variables fisicoquímicas fue adecuado a pesar de las variaciones registradas a lo largo del ensayo.

Diseño experimental

El diseño de los experimentos se basó en las recomendaciones de Muñoz-Escobar y sus colaboradores (2010). Para establecer el número adecuado de organismos por peceras durante la etapa de aclimatación y en las cámaras en la etapa experimental (Sima- Álvarez et, al 2001).

El experimento también se estandarizó con base en la información descrita por Sima-Álvarez y sus colaboradores (2001); para determinar la concentración letal. Por todo lo anterior se puede argumentar que las condiciones sugeridas por los autores y las adaptaciones que se realizaron al diseño experimental fueron óptimas, puesto que los organismos no se

encontraron en condiciones de estrés territorial, gracias a que su talla fue idónea y el espacio de las cámaras fue suficiente.

Efectos en la prueba preliminar (toxicidad aguda)

Los parámetros fisicoquímicos registrados en la prueba preliminar (fase aguda) de este trabajo, no fueron iguales a las condiciones recomendadas por Xipe (2013). En el caso de la temperatura todas las cámaras se encontraron dentro de los parámetros recomendados, sin embargo se presentaron variaciones en dos de los parámetros (pH y OD) durante este ensayo.

En el caso del pH se mostraron diferencias significativas entre los controles y los animales expuestos a las cinco concentraciones (0.06, 0.12, 0.25, 0.50 y 1.0%) de diésel. En las cámaras expuestas a biodiésel las diferencias se registraron únicamente en las concentraciones más altas (0.25, 0.5 y 1.0%), y presentaron similitud con las más bajas (0.06 y 0.12%). En la mezcla no se obtuvieron diferencias como se observó en la tabla 7. Estos resultados se pueden asociar a la adición de las fracciones solubles de los combustibles en las cámaras correspondientes, ya que el agua utilizada en un principio presentó las mismas características. Tanto el agua de los controles como la de los animales expuestos mostraron valores fuera del intervalo recomendado por la bibliografía, sin embargo, no representaron afectaciones relevantes en los organismos.

El valor promedio del oxígeno disuelto registrado en las cámaras control fue de 2.8 ± 1.4 mg/L, en la FS del diésel fue de 2.5 ± 0.9 mg/L, en la FS del biodiésel 2.3 ± 1.2 mg/L y la FS de la mezcla (sin contar la FS 1.0%) fue de 2.4 ± 1.2 mg/L. El resultado de la FS 1.0% (1.8 ± 1.1 mg/L) de la mezcla se consideró por separado, debido a que presentó diferencias tanto con las cámaras control como con las demás concentraciones; está marcada diferencia se podría asociar únicamente a que la FSM al 1.0% generó efectos en los organismos, pues las condiciones fueron similares para todo el experimento, sin embargo, el análisis estadístico corroboró diferencias entre las concentraciones antes mencionadas.

Cabe mencionar que los niveles requeridos de oxígeno disuelto varían en cada especie; algunos animales requieren mayor consumo de energía que otros para sus funciones fisiológicas (comer, reproducirse, etc). Por ejemplo, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) requiere concentraciones mayores a 4.0 mg/L para permanecer saludable. Algunas especies de

crustáceos pueden vivir y reproducirse en ambientes acuáticos donde la concentración de oxígeno disuelto oscila entre 2.0 y 0.1 mg/L. Para los renacuajos de la especie utilizada en esta investigación, el OD recomendado por Xipe (2013) es de 6.4 mg/L. En la fase experimental (toxicidad aguda) del estudio las concentraciones de OD no se encontraron dentro de los niveles óptimos, sin embargo no se observaron afectados ya que los valores fueron similares con los animales de las cámaras control.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la toxicidad del diésel, el biodiésel y la mezcla B20, además de encontrar la concentración letal media en 96 horas (CL_{50-96h}). Este objetivo no se logró cumplir debido a que los registros de mortalidad fueron bajos, de tal manera que no murió la mitad de los animales; este resultado concuerda con los hallazgos de Castro y sus colaboradores (2007). No obstante, cabe mencionar que en este estudio el porcentaje de mortandad obtenido fue mayor en los organismos expuestos al biodiésel, seguido por la mezcla y por último al diésel. No se pudo obtener la CL_{50-96h} , para el biodiésel y la mezcla). En este trabajo se muestra que hubo una afectación causada por la exposición a estos contaminantes. Los datos registrados únicamente en los organismos expuestos al diésel permitieron sugerir una posible CL_{50-96h} . La concentración letal media calculada fue de 2.85% y la CL_{1-96h} obtenida con el registro de mortandad fue de 0.27%. En consecuencia, a partir de los resultados de este bioensayo se propusieron las concentraciones que se utilizaron en la otra etapa del experimento (fase subletal) para lograr detectar daños tempranos a través del uso de biomarcadores. Las concentraciones seleccionadas para la fase subletal fueron 0.06% y 0.12%.

Castro y sus colaboradores (2007) además mencionan que el biodiésel puede ser tóxico e incluso ser letal, siempre y cuando se consuma en grandes cantidades (17.4 g/kg de peso corporal, lo cual equivale a que una persona de 80 kg tomara alrededor de 1.6 L). Si el consumo es mínimo, estos autores lo consideran inofensivo para la fauna acuática. De acuerdo a lo mencionado con anterioridad en este estudio, el biodiésel se consideró poco dañino, pues no generó decesos a pesar del aumento en la concentración, caso contrario a lo que sucedió con el diésel, el cual al aumentar la concentración hubo mayor cantidad de organismos muertos.

En 2007, Khanh y sus colaboradores compararon efectos de toxicidad aguda en

organismos acuáticos (*Daphnia magna* y *Oncorhynchus mykiss*) expuestos a diésel convencional, a biodiésel (B100) y a las mezclas B50 y B20. Ellos concluyeron que el biodiésel y sus mezclas producidos con aceites no comestibles son menos tóxicos que el diésel puesto que, al igual que en este estudio, generaron un porcentaje de mortalidad bajo y no obtuvieron la CL₅₀.

Bluhm y sus colegas (2016), evaluaron la toxicidad aguda de tres biocombustibles potenciales (levulinato de etileno, 2-metiltetrahidrofurano (2-MTHF) y 2-metilfurano (2-MF)) y sus efectos teratogénicos sobre embriones de *Danio rerio*. Además investigaron dos combustibles fósiles (diésel y gasolina) y un biocombustible establecido (éster metílico de aceite de canola), de los cuales en ese mismo orden se manifestó el grado de toxicidad. La gasolina y el biodiésel no presentaron una CL₅₀ y concluyeron que la toxicidad del biodiésel fue menor que la del diésel. En la presente investigación se determinó que para los renacuajos *Lithobates catesbeianus* las fracciones solubles de biodiésel (B100) y la mezcla (B20) resultaron ser menos que las de diésel por no haber logrado obtener una CL₅₀₋₉₆, resultados que coinciden con los de Bluhm et al. (2016) y Kanh (2007), pero se debe tomar en cuenta que el porcentaje de mortandad registrado durante la fase de exposición demostró que biodiésel (B100) y la mezcla (B20) resultaron ser incluso más dañinas que el diésel, aunque esto va a depender de la concentración utilizada de este combustible.

Es importante señalar que al principio la tasa de mortandad de los animales fue similar entre los renacuajos expuestos a los tres combustibles, aunque después de un mes (en la fase de recuperación), el 100% de los renacuajos previamente expuestos al biodiésel murió. Estos datos se registraron en los individuos sometidos a las cinco concentraciones de FSB, lo que sugiere que dicho combustible generó un daño a largo plazo. En contraste, hubo sobrevivientes en los animales previamente expuestos a la mezcla y al diésel (fig. 7). Lo anterior se debe considerar para un mejor manejo de estos biocombustibles, pues las posibles afectaciones a los organismos no siempre son inmediatas.

Efectos en la prueba definitiva (toxicidad subletal)

En la prueba definitiva (fase subletal), la temperatura y el OD también fueron similares en todos los casos (controles y contaminados). El oxígeno disuelto recomendado por Xipe (2013), como ya se mencionó, es de 6.4 mg/L y la concentración obtenida en esta fase

experimental fue de 5.0 - 6.0 mg/L., en el caso de la temperatura los valores estuvieron dentro de los parámetros recomendados por la bibliografía (20 ± 2). Por lo anterior se infiere que los organismos que aquí se evaluaron presentaron un nivel de OD y una temperatura adecuada.

En el análisis de correlación se pudo demostrar que los valores de oxígeno disuelto pudieron influir directamente en los niveles de excreción nitrogenada, representado por una ($r= 0.26$), al ser relacionado con el consumo de oxígeno y con la relación O.N de los individuos la r fue inversa con una $r = -0.27$ y $r = - 0.49$, respectivamente (figs. 36 y 37).

El pH fue menor en los organismos que estuvieron expuestos a todos los combustibles, de manera similar a lo presentado en la fase aguda, aunque la diferencia más relevante se registró únicamente en las cámaras de los organismos expuestos a la FSB 0.12%. Es importante resaltar que los valores de pH se encontraron dentro de los parámetros recomendados.

Aspectos morfológicos

Las etapas de desarrollo (XX - XXV) de los organismos que se utilizaron fueron las adecuadas y se eligieron de acuerdo la descripción de Gosner (1960), pues es en esta etapa se desarrolla la boca y el opérculo en los anfibios. En consecuencia, la absorción de los contaminantes es mayor (por filtración y absorción cutánea). Complementando esta información, Coppo (2003) menciona que en esta etapa los renacuajos presentan características de desarrollo más complejas (*e. gr.*, respiración branquial y corazón con dos cavidades), por lo que la alimentación en esta fase de desarrollo se basa en plancton, algas y microorganismos. En consecuencia, la ingestión de los tóxicos se genera con mayor frecuencia, puesto que estos se encuentran presentes en el agua (absorción cutánea) y, por otro lado, la intoxicación se puede generar a causa del consumo de alimento (comida contaminada). Además, estos animales practican la coprofagia. Las mediciones morfológicas (longitud, peso y ancho) resultaron ser homogéneas en todos los organismos, incluyendo a los controles.

Algunos aspectos morfológicos y de comportamiento se hicieron evidentes durante los ensayos. En el periodo de exposición aguda se percibieron algunos cambios. Los organismos expuestos a las FS de diésel y a la mezcla (0.5 y 1.0%, las concentraciones más altas)

presentaron una coloración rojiza en la región ventral, además de alteraciones en la actividad motriz (agitación).

En la fase subletal los individuos expuestos a las diferentes concentraciones del biodiésel se mantuvieron en la parte superficial de las cámaras y mostraron un comportamiento pasivo. Los organismos expuestos a la mezcla y al diésel mostraron un comportamiento agitado. Se observó una coloración rojiza o anaranjada en la parte ventral. Con el transcurso de los días ésta fue disminuyendo, lo cual se podría relacionar con la posible degradación de los tóxicos.

Otra de las posibles causas por las cuales los organismos contaminados con las fracciones solubles de diésel y la mezcla (FSD y FSM) no se vieron afectados, puede ser la generación de excremento, aunque estos individuos no lo ingirieron. En contraste, los renacuajos expuestos al biodiesel (FSB), si comieron su propio excremento.

Por lo anterior, se puede deducir que los ejemplares intoxicados por las dos concentraciones de diésel y de mezcla, mostraron menor daño; en cambio, los individuos sometidos al biodiésel pudieron bioacumular más el contaminante (por coprofagia). De hecho, al final del ensayo (incluyendo las dos fases, la de exposición y la de depuración), los individuos expuestos al biodiesel murieron.

Respuestas fisiológicas

En este estudio se pudo deducir que el daño que sufrieron los renacuajos se consideró poco grave, de acuerdo con el consumo de oxígeno registrado (tabla 11). No obstante, hubo variación durante todo el ensayo (fase de exposición, [días uno, dos y cuatro], y fase de depuración [días 15 y 30]) y entre todos los grupos de organismos (controles y expuestos). Sin embargo, los valores de este parámetro registrados en el día dos fueron menores en los organismos expuestos, en comparación con los controles. Esto se corroboró con el análisis estadístico, lo cual sugiere un daño generado por los combustibles.

Según Fuentes y Massol-Deyá (2002), el OD es un requisito nutricional esencial para la mayoría de los ejemplares vivos y de él dependen la generación de energía (mediante respiración aeróbica) y la movilización del carbono en las células. Si el consumo de oxígeno en los organismos sufre alteraciones, significa que estos experimentan algún daño. En este

estudio, el agua donde se encontraban los renacuajos contenía suficiente oxígeno disuelto. Los anfibios no requieren mucho gasto energético para su metabolismo al ser organismos ectotermos y no consumen grandes cantidades de oxígeno. Este estudio representa un primer acercamiento a la evaluación del consumo de oxígeno en esta especie, debido a que no hay estudios donde se haya evaluado este parámetro en los renacuajos. Se requiere más investigación sobre este tema.

Contreras (1999) evaluó la excreción nitrogenada a partir de los niveles de amoníaco excretado en el bage; en este trabajo se concluyó que los niveles de este parámetro (2.85 mg/L) podrían ocasionar una CL_{50-24h} de los organismos. En *L. catesbeianus* no se han reportado niveles de amoníaco NH_3 excretado. Según Coppo (2003), los patrones de excreción de nitrógeno no proteico en los anfibios varían dependiendo de la etapa ontogénica en la que se encuentren. Los renacuajos son organismos amoniotélicos con baja excreción de urea. A partir de la etapa de desarrollo premetamórfica, la cantidad de excreción de urea aumenta y con ello las actividades enzimáticas del ciclo de la ornitina (medidas en hígado). Cuando su desarrollo termina (estado de rana adulta), estos organismos son ureotélicos.

Los organismos de este ensayo se encontraban en la etapa XX-XXV según Gosner, por lo que es posible que en estas fases de desarrollo, los organismos no generaran gran cantidad de amoníaco como lo sería en un periodo de crecimiento más temprano, sin embargo tampoco se ubicaban en el estado premetamórfico, por lo que se sugiere que la variación en los niveles de nitrógeno amoniacal con respecto a los controles únicamente se debe a la exposición de los combustibles. Estos datos fueron importantes, debido a que la tasa de excreción nitrogenada si varió a lo largo del ensayo en todas las cámaras (con y sin contaminante). Además, el día dos (fase de exposición) el valor obtenido fue alto, en contraste con el del oxígeno. Los resultados más notables respecto a la exposición a los combustibles se observaron en los organismos expuestos a la FS del biodiésel 0.12%; mostraron diferencias significativas al ser comparados con los controles el día dos, mientras que el día 15 (fase de recuperación) sólo se registró una diferencia significativa pero estas no fueron con respecto a los controles, más bien fueron entre los organismos expuestos a la FSD 0.06% con respecto a los contaminados por la FSM 0.06%.

La integración de los resultados de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada para

determinar el estrés metabólico lleva a las siguientes consideraciones. La evaluación de estrés metabólico es apta para estudiar la fisiología de los organismos, debido a que es un parámetro no invasivo. En este estudio sólo se observaron diferencias relevantes en los días dos y 15. Los valores registrados en este estudio no concuerdan con los reportados por Mayzaud & Conover (1988), puesto que ellos mencionan que para que los organismos se encuentren en equilibrio metabólico (lípidos y proteínas) deben de tener una razón O:N que oscile entre 50 y 60. Valores entre tres y 16 indican que se está usando 100% de las proteínas como fuente de energía metabólica, mientras que tasas mayores de 60 indican que el consumo es de carbohidratos y no de proteínas.

En el caso de los renacuajos *L. catesbeianus* analizados en este trabajo, la razón O:N más elevada se obtuvo en los controles y fue de 37.68 ± 17.38 el día dos (tabla 14), por lo que se asume que todos los organismos estuvieron sometidos a estrés metabólico. Sin embargo, los organismos control mostraron diferencias respecto a los organismos expuestos, por lo que se considera que los resultados indican que si hubo daño en los segundos, derivado de la exposición a los combustibles. En este mismo día se observaron casos de organismos intoxicados con valores menores a cinco (tabla 14), por lo que se plantea que comenzaron a absorber en primer lugar carbohidratos y lípidos, y después de un tiempo al hallarse en una situación de austeridad consumieron sus propias proteínas. En el día 15 se registraron valores que sugieren daño metabólico aunque menor que en los organismos evaluados el día dos, pues en dicho momento sólo se observaron diferencias significativas entre los controles y los organismos expuestos a la fracción soluble del diésel (FSD 0.06%) con un valor de 14.12 y los contaminados con la fracción soluble de la mezcla (FSM 0.06%) con un índice de 17.02.

El análisis estadístico corroboró que hubo una diferencia significativa entre los individuos mencionados con anterioridad; es decir, los animales expuestos a la (FSD) 0.06% y los de la FSM 0.06% (tabla 15), al ser comparados entre sí. Estos resultados indican un gasto energético basado también en el consumo de proteínas (Mayzaud & Conover, 1988), aunque estos valores no fueron tan bajos como los del día dos.

Con base en lo anterior se asume que los resultados obtenidos en el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada por la exposición a dichos contaminantes fueron relevantes. Sin embargo, la relación O:N generó mayor información y permitió concluir que el

día dos (fase de exposición) los organismos mostraron mayor estrés metabólico. Por otra parte, en el día 15 también se registraron valores que reflejaron niveles de estrés, aunque sólo en algunas concentraciones. Lo anterior sugiere que los organismos comenzaron a recuperarse, sin embargo no fue posible en todas las condiciones experimentales, (FSD 0.06% y FSM 0.06%). Con ello se podría considerar que el diésel y la mezcla generan efectos más dañinos que el biodiésel, únicamente en la evaluación de este biomarcador, sin embargo; hasta este momento las diferencias son muy sutiles, por lo que se deberían realizar más estudios. Además, se debe considerar que los efectos del biodiésel no fueron inmediatos en la evaluación de la toxicidad aguda.

Estrés oxidativo a través de la actividad de la catalasa

La estimación del contenido de proteínas fue importante, debido a que éstas son el principal componente de los órganos y estructuras celulares de los tejidos (Pelegrín *et al*, 2004). En consecuencia, cuando estas moléculas sufren alteraciones significa que los organismos están experimentando daños. Esto se podría asociar a un periodo de estrés o falta de alimentación del organismo. Además, la cuantificación de éstas es la base para interpretar la actividad de la catalasa, porque las unidades en las que se registra son U/mg de proteína.

Los resultados obtenidos en *L. catesbeianus* mostraron que el contenido de proteínas varió a lo largo del ensayo tanto en los controles como en los animales expuestos. En los organismos evaluados el día uno (periodo de exposición), el contenido de proteínas fue bajo en general (fig. 16); sin embargo, este día, los renacuajos sin contaminar presentaron un valor proteínico mayor que los intoxicados; conforme transcurrió el tiempo los organismos presentaron similitud entre los grupos.

El día 15 todos los especímenes (casos y controles) presentaron contenidos de proteínas semejantes, a excepción de los intoxicados con la FSD 0.06% y la FSM 0.12%. En la primera concentración los organismos mostraron un valor de proteínas menor que en la segunda; sin embargo, estas diferencias no fueron relevantes respecto a los controles. Cabe mencionar que en este día (periodo de recuperación) los organismos ya consumían alimento, a lo que se le pudo atribuir el aumento del contenido proteínico y el posible cambio en el peso después de terminar la exposición a los combustibles. Esto se confirmó a través de una correlación significativa (aunque baja), entre el peso de los organismos y el contenido de

proteínas ($r = 0.50$; $p < 0.01$). Esta información se sustenta con lo descrito por Luna-Figueroa y sus colaboradores (2000), quienes mencionan que la cantidad y la calidad de las proteínas del alimento influyen en el crecimiento y la reproducción de los animales acuáticos.

Por otro lado, para determinar el estrés oxidativo a través de la actividad enzimática de la catalasa se requiere analizar un órgano blanco (como el hígado o las branquias). Sin embargo, como los animales utilizados en este trabajo estuvieron en las etapas de desarrollo XX - XXV según Gosner (antes de la metamorfosis), sus órgano mejor desarrollado en esta etapa fue el hígado, además de que es un órgano blanco y es en donde se encuentra una gran cantidad de proteínas encargadas de degradar dichos contaminantes.

Cabe mencionar que se encontraron diferencias morfológicas entre los hígados de los organismos control y los animales expuestos a las fracciones solubles del biodiésel (FSB) evaluados en la prueba preliminar (fase aguda). Los animales sin contaminar presentaron un hígado definido y de color rojizo y por otro lado, en los ejemplares de las cámaras con las concentraciones del biodiesel el hígado se percibió de un color amarillento y con una forma indefinida. (fig. 8). No existen datos acerca de la salud del hígado en renacuajos según su color; sin embargo, es un factor a considerar en el futuro para demostrar daño por la exposición a contaminantes (en este caso a las concentraciones del biodiésel).

Los resultados de la evaluación de la actividad enzimática de la catalasa a través de la descomposición del H_2O_2 , reveló que tanto los organismos control como los expuestos al biodiésel a una concentración de 0.06% presentaron un comportamiento estable a lo largo del bioensayo. Los organismos expuestos a la concentración 0.12% de este contaminante y los expuestos a los otros combustibles, presentaron variabilidad los diferentes días que duró el ensayo, sin embargo los resultados puntuales se mostraron los días cuatro y 30, el día cuatro se observó menor actividad en los organismos control en comparación con los expuestos al diésel 0.06% y la mezcla 0.12% (fig. 31), por otro lado el día 30 la diferencia se observó con las diferentes condiciones experimentales excepto los expuestos a biodiesel 0.06%, ya que estos exhibieron un comportamiento semejante al de los controles. . Es importante mencionar que en el día 30 los organismos se encontraban en agua sin contaminante, y a pesar de ello se determinó estrés oxidativo.

Con lo anterior se puede sugerir que el efecto de los combustibles evaluado en este parámetro (actividad enzimática de la catalasa) no es inmediato, ya que los daños relevantes a nivel bioquímico se observaron en periodo de recuperación y no de exposición, mencionando además que el día 15 se observó una aparente recuperación. Cabe mencionar que el daño se consideró poco grave debido a que no ocasionó la muerte de los individuos, no obstante al igual que en la evaluación de estrés metabólico, los organismos expuestos al diésel y a la mezcla se observaron más dañados en comparación con los contaminados con biodiésel. Cabe mencionar que la actividad enzimática de la catalasa, no tuvo correlación con ningún parámetro fisicoquímico ni fisiológico, esto se podría deber a que los daños en los organismos se registraron en diferentes días.

Para corroborar estos resultados se sugeriría realizar más estudios sobre las afectaciones de los combustibles a nivel bioquímico en *L. catesbeianus*. Además se debe considerar el tiempo del bioensayo; el periodo de exposición debería ser mayor a 96h y, aunque se coloquen a estos organismos en periodo de recuperación, las pruebas de los biomarcadores deberían hacerse con mayor frecuencia a lo largo del ensayo para obtener observaciones más completas.

Es necesario indicar que no existen aún estudios que evalúen el estrés oxidativo generado por exposición a combustibles en renacuajos de la especie aquí utilizada. Sin embargo, da Silva - Veronez, (2016), realizó la evaluación de daños en los niveles morfológico, genético, bioquímico (estrés oxidativo) y de retraso en la metamorfosis, causado por la acumulación de minerales como el hierro y el manganeso.

Otros autores han evaluado el estrés oxidativo en otros organismos, utilizando diferentes biomarcadores como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), en carpas (*Cyprinus carpio*) expuestas a nanopartículas de óxido de Zinc (ZnO) (Hao & Chen, 2012).

Con *Xenopus laevis* también se han realizado evaluaciones de estrés oxidativo ocasionado por la exposición a metales o la mezcla de estos, con los biomarcadores glutatión-S-transferasa (GST), glutatión reductasa (GR), acetilcolinesterasa (AChE), carboxilesterasa (CaE), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). Además, se hizo la determinación de las

concentraciones de metalotioneínas (Yologlu & Ozmen, 2015).

En la rana ribunda se evaluó el estrés oxidativo asociado al cambio que sufren al terminar su periodo hibernación (Bagnyukova, 2003).

Por otro lado, algunos de los trabajos donde se han registrado daños ocasionados por los combustibles aquí estudiados (diésel, biodiésel puro y mezcla B20), se han realizado con los siguientes organismos acuáticos: *Oncorhynchus mykiss* y *Daphnia magna* (Khan *et al.*, 2007), *Oreochromis niloticus* (Nogueira, 2011), *Pterygoplichthys anisitsi* (Nogueira, 2013) y *Danio rerio* (Cavalcante *et al.*, 2014). En estos organismos se han determinado daños genéticos, bioquímicos y citotóxicos, entre otros, como se mencionó con anterioridad. Lo relevante de estos trabajos es que en conjunto han concluido que el biodiésel y las mezclas con menor porcentaje de diésel (la mezcla B50, B20 incluso la B10), son menos dañinos que el diésel convencional. Bluhm *et al.*, 2016 también menciona que combustibles como la gasolina y el biodiésel generan menor efecto tóxico que el diésel.

En nuestro estudio, se puede decir algo similar, ya que en la evaluación de estrés oxidativo, en primera instancia los organismos expuestos al diésel y a la mezcla se mostraron afectados y aunque los expuestos al biodiésel también mostraron afectaciones, éstas únicamente fueron en la concentración más alta (0.12%), ya que los intoxicados a la FS 0.06% tuvieron un comportamiento similar a los controles. Cabe mencionar que en algunos días las diferencias entre los organismos no fueron tan evidentes. Es por ello que sería recomendable realizar más estudios para examinar la toxicidad de estos combustibles en estos y otros anfibios.

Por último aunque en este trabajo no se logró calcular la CL₅₀, lo cual concuerda con lo descrito por Khan *et al.* (2007), Nogueira *et al.* (2011), Nogueira *et al.* (2013) y Cavalcante *et al.* (2014), no significa que el biodiésel sea cien por ciento amigable para el ambiente, ya que se registraron daños por dicha exposición. Sin embargo, la baja toxicidad que se le atribuye al biodiésel también puede deberse a lo que menciona Pereira & Mudge (2004), este biocombustible causa menos daño debido a que entra en un proceso de biodegradación antes de entrar al organismo, lo que minimiza su efecto. Sin embargo si el organismo estuviese en constante contacto con dichos contaminantes, el individuo lo acumularía y es lo que causaría

daño. La biodegradación es el destino final de cualquier aceite no recogido o quemado en caso de derrame accidental. La falta de información sobre este tema sustenta la relevancia de este trabajo, puesto que en la actualidad o en un futuro cercano estos combustibles serán el sustituto completo del diésel y por ende se ocuparán en mayor cantidad, por lo que los accidentes con dichas sustancias no serán inusuales. Según Bucas y Saliot (2002), se han registrado numerosas catástrofes de aceite vegetal (vertido de forma directa) en el mar. Es por ello que se está estudiando la degradación de dichos compuestos a partir de la actividad de microorganismos. Esto, sin embargo, no asegura que otros animales no sufran daños por la exposición a dichas sustancias (dependiendo del tiempo que dure el accidente). En el caso de los renacuajos de *L. catesbeianus* se observaron daños en etapa de recuperación a pesar de que la exposición a los combustibles sucedió tiempo atrás, por lo que se recomendaría monitorizar sitios donde existan derrames previos para evaluar la salud de los individuos y así evitar daños potenciales.

Existen pocos estudios acerca del daño ambiental y a la salud que estos combustibles podrían causar a la biota en caso de un incidente o derrame (De Mello, 2007).

6 Conclusiones

- Los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH y OD) durante la etapa de mantenimiento fueron los adecuados, puesto que fueron semejantes a los recomendados en la bibliografía.
- Durante la etapa experimental los valores de pH y oxígeno disuelto se encontraron por debajo del intervalo recomendado, sin embargo, se considera que no interfirieron en la evaluación debido a que fueron similares entre los controles y los animales expuestos.
- Los lotes de organismos fueron homogéneos en cuanto a su peso húmedo, anchura y longitud.
- La CL_{50-96h} para el caso del diésel fue de 2.85% y la CL_{1-96h} fue de 0.27%. Para los expuestos al biodiesel y a la mezcla no se logró obtener este parámetro; sin embargo, los organismos en periodo de recuperación presentaron una mortalidad del 100% en 30 días.
- Aunque no se logró obtener la CL_{50-96h} , las afectaciones registradas demuestran que tanto el biodiésel como la mezcla causan daños a los organismos, incluyendo concentraciones bajas.
- A través de la evaluación de estrés metabólico se observó que los organismos se vieron afectados tanto en días de exposición como en recuperación. El día dos (exposición) los valores de los organismos expuestos a todos los combustibles fueron muy bajos en comparación con el control (consumieron sus propias proteínas). El día 15 (recuperación) solo se observó recuperación en los organismos expuestos al biodiesel 0.06% la mezcla 0.12%.
- Los combustibles no afectaron a los organismos en su contenido de proteínas, ya que los resultados mostraron homogeneidad tanto en controles como en expuestos.
- Se observó estrés oxidativo el día cuatro (en la FS 0.12% del diésel y de la mezcla) con una aparente recuperación el día 15, sin embargo el día 30 se registró estrés oxidativo en todas las concentraciones, menos en la FS 0.06% del biodiesel.
- Se demostró que todos los combustibles tienen efectos tóxicos en *L. catesbeianus* en los niveles metabólico y bioquímico, con excepción del biodiesel 0.06%.

- Los daños ocasionados por los biocombustibles no fueron inmediatos, por lo que en caso de un derrame se deberán realizar monitoreos de los organismos aún después de que se disipen los combustibles como alerta de un riesgo ecológico a largo plazo.
- Este estudio proporciona elementos que podrían contribuir a la a evaluación del riesgo asociado al uso de estos combustibles, ya que en un futuro cercano será mayor su utilización.
- *Lithobates catesbeianus* es una especie con la que no se han realizado suficientes estudios toxicológicos, pero al pertenecer al grupo de los anfibios, puede ser considerado como un buen organismo bioindicador.
- La coloración y la forma del hígado observadas en la fase aguda sugieren que se debería considerar realizar estudios en este órgano para analizar daños fisiológicos en la especie.

7. Perspectivas y recomendaciones

- Para poder calcular la CL₅₀ de la toxicidad aguda, se recomendaría usar concentraciones más altas de los combustibles utilizados
- Se recomienda el uso de varios biomarcadores simultáneos para evaluar estrés oxidativo y de esta manera conocer la salud de los organismos.
- Se debe considerar realizar más evaluaciones durante y después del periodo de exposición a dichos combustibles, puesto que en esta ocasión la recuperación fue aparente, pero transitoria, y después se registró un daño mayor e inclusive la muerte.
- Se sugiere realizar una caracterización cromatografía para conocer los compuestos de los combustibles y así determinar cuáles de estos pueden dañar a los organismos, además de evaluar el tejido de los individuos expuestos para conocer la cantidad acumulada en ellos y de esta manera obtener una evaluación más completa.
- Para un mejor y más completo dictamen sobre la salud de los especímenes se debe considerar realizar una batería de ensayos (con diferentes especies de organismos) más amplia para lograr comparar los resultados de los efectos toxicológicos de los contaminantes en diferentes especies.
- Se sugiere realizar más investigaciones sobre estos combustibles y otras mezclas como la B5, para prevenir daños significativos al ambiente.
- En la evaluación subletal se recomienda un periodo de tiempo de exposición mayor a 96 h y que las evaluaciones de biomarcadores durante el ensayo sean más frecuentes.
- En caso de derrames accidentales se sugeriría realizar monitoreos ambientales como alerta a un riesgo de acumulación de los combustibles evaluados en este trabajo. De esta manera evitar daños severos a largo plazo.

8. Bibliografía

- Ahmed, R. G. 2005. Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 15(2): 55-63.
- Anderson, J. W., J. M. Neff., B. A. Cox., H. E. Tatem., & G. M. Hightower 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine.Biology*, 27(1): 75-88.
- Andreu, G. C., X. A. Miguel., & R. C. Aviña (2015). La introducción y el cultivo de la rana toro (*Rana catesbeiana*).¿ Un atentado a la biodiversidad de México? *Ciencia Ergo-Sum*, 8(1): 62-67.
- Álvarez, R. S., M. M. Muñoz., M. R. Serna., & J. G. Ricalde. 2001. Determinación de La Concentración Letal Media (CI₅₀) y efecto Histopatológico del permanganato de potasio, en renacuajos de rana toro *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). Revista: *Universidad y Ciencia* 34(17).
- Atli, G., & M. Canli. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8): 1884-1889.
- Bagnyukova, T. V., K. B. Storey., & V. I. Lushchak. 2003. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *Journal of Thermal Biology*, 28(1): 21-28.
- Balat, M., & H. Balat. 2010. Progress in biodiésel processing. *Applied Energy*, 87: 1815-1835.
- Bantle, J., J. Dumont., R. Finch., & G. Linder. 1991. Atlas of abnormalities. A guide for the performance of FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay_ *Xenopus*). U.S. Army Medical Research and Development Command, Washington, D.C.68 pp.
- Barrera-Escorcía, G. 2006. Toxicidad del cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la Laguna de Mandinga, Veracruz. Tesis de doctorado en ciencias (Biología). Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico. 252 pp.
- Berrill, M., S. Bertram., L. McGillivray., M. Kolohon., & B. Pauli. 1994. Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(4): 657-664.

- Blaustein, A. R. 1994. Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica*, 50 (1): 85-97
- Blaustein, A. R., & D. B. Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 272 (4): 52-57.
- Bluhm, K., T. B. Seiler., N. Ander., J. Klankermayer., A. Schaeffer., & H. Hollert. 2016. Acute embryo toxicity and teratogenicity of three potential biofuels also used as flavor or solvent. *Science of the Total Environment*, 566: 786-795.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitivity method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.
- Bravo, E. 2007. Biocombustibles, cultivos energéticos y soberanía alimentaria en América Latina. Encendiendo el Debate sobre Biocombustibles. Buenos Aires, Argentina: Cap. Intelectual 23-97. Disponible en línea en: http://wrm.org.uy/oldsite/temas/Agrocombustibles/Libro_RALLT.pdf (consultado el 3 de noviembre del 2014)
- Bucas, G., & A. Saliot. 2002. Sea transport of animal and vegetable oils and its environmental consequences. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 1388-1396.
- Bury, R. B., & J. A. Whelan. 1985. Ecology and management of the bullfrog, United States Department of the Interior. *Fish and Wildlife Service Resource Publication* 155. Washington, D.C., 23 pp.
- Canton, J. H., & W. Slooff. 1982. Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd) with freshwater organism of different trophic levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 6 (1): 113-128.
- Castro, P., J. Coello., & L. Castillo. 2007. Opciones para la producción y uso del biodiésel en el Perú. Soluciones prácticas ITDG (Tecnología derivado de la pobreza). Lima, Serie Libros N°51.
- Cavalcante, D. G.S., N. D. Da Silva., J. C. Marcarini., M. S. Mantovani., M. A. Marin-Morales., & C. B. Martinez. 2014. Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of diésel produced by different routes on ZFL cell line. *Toxicology in Vitro*, 28 (6): 1117-1125.
- CIDEM (Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán), 2010. Manual de producción de Rana Toro. Michoacan. México. 69 pp. Disponible en línea

<https://es.scribd.com/document/78121328/2010062492152-Manual-de-Produccion-de-Rana-Toro> (consultado el 4 de noviembre 2014).

- Cohen, G., D. Dembiec., & J. Marcus. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical biochemistry*, 34(1): 30-38.
- Coppo, J. A. 2003. El medio interno de la “rana toro” (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). *Revista Veterinaria*, 14(1): 25-41.
- Contreras, T. M. M.. 1999. Evaluación del crecimiento de juveniles del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados con desecho de calamar. Tesis de Maestría en ciencias (acuacultura). Facultad De Ciencias Marinas. Universidad de Colima, Mexico. 59 pp.
- Da Silva-Veronez, A. C., R. V. Salla., V. D. Baroni., I. F. Barcarolli., A. Bianchini., C. B. dos Reis Martinez., & A. R. Chippari-Gomes. 2016. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquatic Toxicology*, 174: 101-108.
- De Mello, J. A., C. A. Carmichael., E. E. Peacock., R. K. Nelson., J. S. Arey., & C. M. Reddy. 2007. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Marine Pollution Bulletin*, 54 (7): 894-904.
- Devillers, J., & J. M. Exbrayar. 1992. Ecotoxicity of chemicals to amphibians. *Gordan and Breach Science Publishers*, Lyon, France, 337 pp.
- Depledge, M. H., & M. C. Fossi. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment . *Invertebrates. Ecotoxicology*, 3 (3): 161-172.
- Diaz de Pascual, A., & O. A., Chacón. 2002. Informe Final Del Proyecto: Diagnóstico de la colonización de la rana toro (*Rana Catesbeiana Shaw 1802: Ranidae: Amphibia*), en el Estado Mérida y Medidas para su control. Universidad de los Andes (ULA). Ministerio del ambiente y de los Recursos Naturales (MARN) Bulfrog Foundation. Edo. Mérida
- Diechman, J. D., & D. Mergara. 1948. Comparative evaluation of some methods used to express the degree of toxicity of a compound. *Journal Aquatic Toxicology*, 2: 157-164.
- Espina, S., & C. Venegas. 2005. Ecofisiología y contaminación p.53-78. In: A.V, Botello, J. Rendon von Osten, G. Gould Bouchot & C. Agraz-Hernández. (Eds). Golfo de México, Contaminación e Impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. 2da edición. Universidad.

Autónoma. de Campeche. Universidad. Nacional. Autónoma de Mexico, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp.

- Freda, J. 1986. The influence of acidic pond water on amphibians: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 30(1): 439-450.
- Fordham, C. L., J. D. Tessari., H. S. Ramsdell., & T. J. Keefe. 2001. Effect of Malation on survival, growth, development and equilibrium posture of bullfrog tadpoles (*Rana catesbiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (1): 179-184.
- Fuentes F., & Massol-Deyá A. 2002. Nutrientes y Gases. Manual de laboratorios ecología de microorganismos. Universidad de Puerto Rico, 17 pp.
- Gallo-Delgado S. M., J. A. Palacio Baena., & P. D. A. Gutierrez-C. 2006. Efectos del insecticida clorpirifos sobre a tasa de crecimiento y la metamorfosis de *Smilisca phaeota* (Cope,1862) (Anura:Hylidae). *Actualidades biológicas*, 28(84): 51-58.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 16 (3): 183-190.
- Gold-Bouchot, G., & O. Zapata-Pérez. 2004. "Contaminación, ecotoxicología y manejo costero" In: Rivera Arriaga, E., G. J. Villalobos, I. Azuz Adeath., & F. Rosado-May (eds.). El Manejo Costero en México. Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad, Universidad de Quintana Roo, 654: 277-286.
- Hao., L. & L. Chen. 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 103-110.
- Hall, R. J., & Kolbe, E. (1980). Bioconcentration of organophosphorus pesticides to hazardous levels by amphibians. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 6(4): 853-860.
- Hall, R. J. 1990. Accumulation, metabolism and toxicity of parathion in tadpoles. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 44(4): 629-635.
- Hebert, A. G. 1995. Acetyl Cholinesterase activity in acuatic organism as pollution biomarker. *Zeitschaift fur Angewandte Zoologye*, 1-15.

- Hopfer, S. M., M. C. Plowman., K. R. Sweeney, J. A. Bantle., & F. W. Sunderman. 1991. Teratogenicity of Ni²⁺ in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure. *Biological trace element research*, 29(3): 203-216.
- Huaiquilaf, B. C. 2008. Contaminación de aguas subterráneas por hidrocarburos líquidos livianos en fase no acuosa. *Ciencia, Ahora*, 22: 20-29 pp.
- Kemp, W. H. 2006. Diésel: basics and beyond-Canada: Aztext press *In*: Medina Ramirez, I. E., N. A. Chávez-Vela., & J. J. Rincon. 2012. Biodiesel, un combustible renovable. *Investigación y Ciencia*, 20 (55): 62-70.
- Kohen, R., & A. Nyska. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6): 620-650.
- Khan, N., M. Mostafa., A. Warith., & G. Luk. 2007. A Comparison of Acute Toxicity of Biodiésel, biodiesel blend, and diesel on aquatic organism. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 57(3): 286-296.
- Lannoo, M. 1995. Invasive species specialist group and bullfrogs. *Froglog* 13:1-7
- Lascano, C. I., V. Sotomayor., A. Ferrari., & A. Venturino. 2009. Alteraciones del desarrollo embrionario, Poliaminas y Estrés oxidativo inducidos por plaguicidas Organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta toxicológica argentina*. 17 (1): 8-19.
- Li, M., C. Hu., Q. Zhu., L. Chen., Z. Kong., & Z. Liu. 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae), *Chemosphere*, 62(4): 565-572.
- Lee, S.W., T. Herage., & B. Young. 2004. Emission reduction potential from the combustion of soy methyl ester fuel blended with petroleum distillate fuel. *Fuel* 83(11): 1607-1613.
- Livingstone, D.R. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revista de Medicina Veterinaria*; 154 (6): 427-430.
- Luna-Figueroa, J., J. F. Torres., & L. P. Hernández de la Rosa. 2000. Efecto de alimentos con diferente contenido proteico en la reproducción del pez angel *Pterophyllum scalare* variedad perlada (Pisces:Cichlidae). *Artículos y Ensayos*, *Ciencia y Mar*. 4(11).

- Marco, A. 2002. Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios. *Revista Española de Herpetología*, Vol. Especial: 97-109.
- Marco, A., & A. Blastein. 1998. Egg gelatinous matrix protects *Ambystoma gracile* embryos from prolonged exposure to air. *Herpetological Journal*, 8(4): 207-11.
- Mayzaud, P., & R. J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 45(3): 289-302.
- Mazzoni, R. 1999. Cría de ranas en América del Sur. Infopesca Internacional, (1), ENEMAR. SEMARNAP. México.
- Medina- Ramírez, I. E., N.A. Chávez- Vela. J. J. Rincón. 2012. Biodiesel, un combustible renovable. *Investigación y Ciencia*, 20(55): 62-70.
- Milena, O. C. D., & J. F. González. 2008. Oxidative stress in fishes caused by environmental contaminants. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55:115-126
- Moyle, P. B. 1973. Effects of introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. *Copeia*, 18-22.
- Muñoz-Escobar, E. M., & J. A. Palacio-Baena¹. 2010. Effects Of Mercury Chloride (Hgcl₂) On the survival and growth of tadpoles of *Dendrosphus Bogerti*. *Actualidades Biológicas*, 32(93): 189-197.
- Nebeker, A.V., G. S, Schuytema., & S. L Ott. 1995. Effects of cadmium on growth and bioaccumulation in the northwestern salamander *Ambystoma gracile*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(4): 492-499.
- Nogueira, L., A.L. M. Sanchez., D. G. H. da Silva., V.C. Ferrizi., A. B. Moreira., & E.A. de Almeida. 2011. Biochemical Biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diésel oil, pure biodiésel and biodiésel blends. *Chemosphere*, 85(1): 97-105
- Nogueira, L., D. G. H da Silva., T.Y. K Oliveira., J. M. C.da Rosa., A. A Felicio., & E. A. de Almeida. 2013. Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diésel oil, pure biodiésel and biodiésel blends. *Chemosphere*, 93(2): 311-319.
- NRC.1987 Committee on biological markers. (National Research Council). The Committee on Biological Markers of the National Research Council. (1987). Biological Markers in Environmental Health Research. *Environmental Health Perspectives*, 3-9.

- Ouellet, M. 2001. Amphibian deformities: current state of knowledge, pp.617-646, in Sparling, D. W., G. Linder., & C. A. Bishop, (eds.). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC Press, Pensacola,FL. In: Marco, A. 2003. Impacto de radiación ultravioleta y contaminación en anfibios. *Munibe*, 16: 44-45.
- Pasqualino, J. C., D. Montané., & J. Salvadó. 2006. Synergic effects of biodiésel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and bioenergy*, 30(10): 874–879.
- Pereira, M. G., & S. M. Mudge. 2004. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. *Chamosphere* 54(3): 297-304.
- Pelegrín, E., I. Fraga., S. Álvarez., J. Galindo., & J. Barbarito. 2004. Efecto de diferentes niveles de proteína en la dieta de renacuajos de Rana Toro (*Rana catesbeiana*). *Comunicación Científica CIVA*, 557-565 pp.
- Pierce, B. A.1985. Acid tolerance in amphibians. *Bio Science*, 35 (4): 239-243.
- Prince, R. C., C. Haitmanek., & C. C Lee. 2008. The primary aerobic biodegradation of biodiésel B20. *Chemosphere*, 71(8): 1446-1451.
- Poon, R., I. Chu., V. E. Valli., L. Graham., A. Yagminas., B. Hollebone., G. Rideout., & M. Fingas. 2007. Effects of three biodiesels and a low sulfur diesel in male rats--a pilot 4-week oral study. *Food and Chemical Toxicology*, 45(10): 1830-7.
- Reyes, M. E. A., O. C. Hondal., J. T. Hernández., & M. A. T Alemán. 2003. Sulfato de Cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana *Osteopilus septentrinalis*. *Retel revista toxicológica*. Universidad de la Habana. Centro de investigaciones pesqueras. Centro Nacional de Toxicología. La Habana. Cuba. 1:10, disponible en línea en <http://sertox.com.ar/retel/default/htm> (consultado en 3 de noviembre del 2014).
- Rueda-Almonacid, J. V. 1999. Anfibios y reptiles amenazados de extinción en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 23 (suplemento especial): 475-498.
- Rueda-Almonacid, J. V. 2000. Situación actual y problemática generada por la introducción de “Rana Toro” a Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 23 (Suplemento especial): 367-393.
- Rodríguez-Serna, R., M. Sima-Álvarez., C. Carmona-Osalde., & C. Reyes-Sosa 1998. Determinación de la DL₅₀ de la sal común (NaCl) en renacuajos de rana *catesbeiana* (Shaw, 1810)

- (Anuran:Ranidae), como tratamiento profiláctico en la actividad ranícola. *Universidad y Ciencia*, 26:59-64.
- Sandoval, M. T., C. Pérez-Coll., J. Herkovits. 2003. Efectos del insecticida Malathion sobre embriones y larvas de *Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae). *Universidad Nacional Del Nordeste Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas. Biológicas*, 022:1-3.
- Secretaría de Energía (SENER), / BID/ GTZ (Edit.). 2006. Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiésel para el Transporte en México, D.F. Disponible en: http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/potenciales_viabilidad_bioetanol_biodiesel_mexico.pdf (consultado el 7 de junio 2014)
- SEDER. 2005. Manual para el cultivo de rana toro (*Rana catesbeiana*). Secretaria de Desarrollo Rural Gobierno del Estado de Nayarit. Disponible en línea: <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Rana/Manual%20para%20el%20cultivo%20de%20rana%20toro.pdf> (consultado el 15 de junio 2014).
- Sima-Álvarez, R., M. Mejía-Muñoz., M. Rodríguez-Serna., & F. J. Güemes-Ricalde. 2001. Determinación de la concentración Letal media (Cl₅₀)y efecto histopatológico del permanganato de potasio en renacuajos de rana toro *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *Universidad y Ciencia*, 34(17): 65-72
- Suazo-Orduño, I., & J. Alvarado-Díaz. 2004. Anfibios: Centinelas de la biodiversidad *In: Revista Ciencia y Desarrollo*, Autenticos Guardianes de la biodiversidad 30:178. Mexico.
- Sztrum A. A. 2010. Susceptibilidad diferencial al níquel en distintos estadios del desarrollo embrionario-larval de *Rhinella* (*Bufo*) *arenarum*. Tesis de Doctorado.en ciencias. Facultad de Ciencias Naturales y exactas). Universidad de Buenos Aires, 163 pp.
- Ultsch, G.R., M. A Bradford., & J. Freda, 1999. Physiology: Coping with the environment. *In: McDiarmid, R.W., Altig, R. (Eds.). Tadpoles: The biology of anuran larvae. The University of Chicago Press, Chicago*, 189-214.
- Van Gerpen, J. 2004. Biodiésel Fuels. *Encyclopedia of Energy. Science direct*, 151-162. pp
- Van der Oost, R. J. Beyer., & N.P. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. Assessment *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13:57-149.
- Waldman, B., & M. J. Ryan.1983. Thermal advances of comunal egg mass deposition in Wood frogs (*Rana sylvatica*). *Journal of Herpetology*, 17(1): 70-72.

- Ward, D., & O. J. Sexton. 1981. Anti-predator role of salamander egg membranes,. *Copeia*. 3, 724-726.
- WHO. 1996. Diésel Fuel and Exhaust Emissions. Wold Healt organization International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 171, Prepared by members of the Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol Research, Germany, under the coordination of G. Rosner. WHO, Geneva Switzerland.
- Xipe A. C. 2013. Manual de producción de Rana Toro. Alternativa sustentable de produccion rural. Tuxpan, Michoacán.
- Yologlu, E., & M. Ozmen. 2015. Low concentration of metal mixture exposures have adverse effects on selected biomarkers of *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic toxicology* 168: 19-27.



EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD
DEL BIODIESEL EN RENACUAJOS
DE RANA TORO *Lithobates*
catesbeianus

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 12 del mes de diciembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. RODOLFO OMAR ARELLANO AGUILAR
MTRO. MARIO ALEJANDRO MUÑOZ NAJERA
DR. HECTOR BARRERA VILLA ZEVALLOS



CLAUDIA VERONICA DE LA CRUZ MORENO

ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (ENERGIA Y MEDIO AMBIENTE)

DE: CLAUDIA VERONICA DE LA CRUZ MORENO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISSASI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. RODOLFO OMAR ARELLANO AGUILAR

VOCAL

MTRO. MARIO ALEJANDRO MUÑOZ NAJERA

SECRETARIO

DR. HECTOR BARRERA VILLA ZEVALLOS